

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DILZA TREVISAN SILVA

Estudo de astacinas (metaloproteases) do veneno de aranhas-marrons (gênero  
*Loxosceles*): obtenção de formas recombinantes e análises proteômicas

Curitiba

2012

DILZA TREVISAN SILVA

Estudo de astacinas (metaloproteases) do veneno de aranhas-marrons (gênero *Loxosceles*): obtenção de formas recombinantes e análises proteômicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Senff Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga

Curitiba

2012

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná  
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

## PARECER

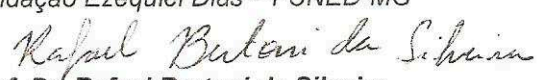
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga**

Co-orientador e presidente da banca  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

  
**Prof. Dr. Eládio Oswaldo Flores Sanchez**

Fundação Ezequiel Dias - FUNED-MG

  
**Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira**

Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

  
**Prof. Dr. Fabricio Klerynton Marchini**

Instituto Carlos Chagas - ICC

  
**Prof. Dr. Francisco Filipak Neto**

Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

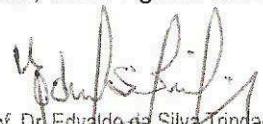
**Prof. Dr. Rubens Bertazolli Filho**

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Dilza Trevisan Silva**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Estudo de astacinas (metaloproteases) do veneno de aranhas-marrons (gênero *Loxosceles*): obtenção de formas recombinantes e análise proteômica" são de parecer favorável à **APPROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de DOUTORA em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Agosto de 2012

  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular - UFPR  
Matr. 185795





Aos meus pais, irmãos e à tia Dione.  
Pelo apoio pleno, pelos conselhos, pela  
confiança a mim depositada, pelos exemplos  
de seriedade e dedicação e pelo amor  
incondicional. Vocês são meus eternos  
mestres. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelas benções recebidas a cada dia. Sem Ele nada mais faz sentido.

Aos meus pais, Zaqueu Connor Silva e Dilma Trevisan Silva, pela constituição de uma família maravilhosa e pela dedicação das suas vidas aos filhos. Agradeço pela educação, pelos princípios ensinados, pela convivência, pelos tropeços, pelas viagens, pelo apoio, pela amizade, pela cumplicidade e pelo amor incondicional. Vocês são meus eternos amores!

À minha tia Dione Trevisan por ser minha segunda mãe, isso resume tudo. Agradeço por estar sempre ao meu lado, pelo apoio em todas as minhas decisões, pela amizade, pelos passeios, pelos conselhos e pelo carinho e amor! Você é meu exemplo de vitória.

Aos meus irmãos, Jonas Rufino Silva Neto e Zaqueu Connor Silva Filho (Nino), por serem meus maiores conselheiros e incentivadores. Agradeço por absolutamente todos os momentos, desde a nossa infância. Obrigada por sempre cuidarem de mim com carinho, atenção e imensa amizade. Agradeço também todos os ensinamentos. Vocês são meus exemplos de dedicação à família e à profissão. Sinto-me privilegiada por ser a Zzinha de vocês!

À minha avó, Clarita Connor Silva, à tia Joice Connor Silva Ribas, ao tio Manoel José Ribas e à minha prima Cinthia Connor Silva Ribas, pelo apoio, pela confiança, por acreditarem no meu potencial e por sempre se preocuparem comigo.

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski pela existência desse grupo de pesquisa, pelos incentivos durante minha iniciação científica, pelas ótimas aulas ministradas e pela dedicação à ciência brasileira.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andrea Senff-Ribeiro, pelo apoio na realização dessa tese, pelos ensinamentos, pelas sugestões científicas, pela cuidadosa correção dos meus textos ao longo do desenvolvimento desse

projeto, pela confiança em meu trabalho e pela oportunidade de crescimento profissional. Agradeço por deixar transparecer seu amor à ciência e passar isso aos seus alunos. Obrigada pela amizade e cumplicidade. Foi muito bom ter sido sua aluna, aprendi muitas coisas e com certeza esses anos foram ótimos e nortearão minha carreira científica.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, pelas ideias e sugestões, pela dedicação em manter a ótima estrutura do laboratório, pelo envolvimento com todos os projetos desenvolvidos e pela amizade ao longo desses anos.

À Profa. Dra Olga Meiri Chaim pela dedicação ao laboratório, aos projetos e aos alunos, pela disponibilidade em ajudar a todos e em diversos momentos, especialmente nos horários não muito triviais, pela agilidade e criatividade nas sugestões e correções de relatórios e dessa tese. Pela nossa amizade coxa-branca.

À Dra Luiza Helena Gremski pela serenidade e disposição com que auxilia todos os alunos, pela delicadeza empregada em todas as situações e por se empenhar com os problemas de cada um. Especialmente, pela paciência em me ensinar, pelas discussões de cada resultado, pelas sugestões e direcionamentos, pela minuciosa correção da tese, pelas ótimas conversas ao longo desses anos de amizade. Você é meu exemplo de profissionalismo, de cientista e de professora.

À Valeria Pereira Ferrer, pela cumplicidade em todos os momentos, por me ajudar em inúmeros experimentos com dedicação e seriedade, pela companhia no barco das proteínas insolúveis e inativas. Aproveito para lhe parabenizar por ter saído desse barco, isso é reflexo do seu empenho, inteligência e persistência.

À todos os amigos do LME, Fernando Matsubara, Gabriel Meissner (meu eterno pupilo e orgulho!!), Ana Carolina Wille, Larissa Vuitika, Daniela Buch, Adriano Morgon (irmão metalo), Matheus Belisário, Aline Bednaski, Marianna

Bóia, Thiago Lopes de Mari, Kiane da Silva (minha pupila), Fernanda Souza, Mariana Magnoni, Marta Oliverio, Eduardo Soares, Eduardo Mendonça, Lucas Pedrosa. Vocês não pouparam esforços em me ajudar, mesmo sem que eu solicitasse. A agradável família LME só é possível com empenho, amizade e dedicação de cada um de vocês. Não há dúvidas de que essa tese não seria realizada sem a colaboração diária de todos, orientadores, pós-doc, doutorandos, mestrandos e iniciações científicas. Agradeço pelos momentos de descontração, pelas festas, pelas brincadeiras, pelos jogos assistidos juntos. Meu imenso agradecimento a vocês.

Em especial, ao Adriano Morgon, pelo alegre companheirismo com a árdua tarefa de conseguir as astacinas e por ter feito as predições das estruturas 3-D das astacinas dessa tese. À Kiane da Silva, por ter me ajudado em muitos experimentos durante a sua iniciação científica.

Em especial, à Marianna Bóia e à Aline Bednaski, obrigada por todos os momentos, pela ajuda no laboratório, pelas viagens, pelos churrascos, pelas festas, pela academia, pelas conversas, pelos doces, pelas risadas e pelos dias de descanso. Marianna está na minha vida há mais tempo, é amiga para todas as horas, me incentiva, acalma e me engorda com suas ótimas comidas. Obrigada pela sua amizade e carinho!

Aos meus amigos, Diego de Araujo Sabri (Popó) e Chelin Auswaldt Steclan (Che), pela harmonia de convivência na nossa *Sweet Nerd's Home*.

Popó, obrigada pelas longas conversas na varanda, por me apresentar milhares de músicas e filmes inspiradores, pela agradável companhia em vários momentos (refeições, jogos, festas, CQC, viagens). Obrigada pelo carinho, cuidado, pelos conselhos, discussões enriquecedoras e por me fazer lembrar que sou: “o melhor do melhor do mundo em esquecer (hehehe)”. Como é difícil encontrar palavras para lhe agradecer, gostaria de lhe dedicar trechos de duas músicas, para ver que todo seu esforço em fazer eu conhecer várias músicas valeu a pena. Uma que me traduz você: “tem tanta gente boa por aí, com essa missão é que de fazer sorrir, felicidade essa é minha escola” e outra

para você “*when your down in trouble and you need someone and care and nothing, nothing is going right, close your eyes and think of me, and sure I’ll be there... You’ve got a friend*”.

Che, obrigada pelas longas conversas, pela paciência em ouvir as minhas angústias, pelas discussões científicas e pessoais, pelo carinho, pela companhia nas noites de experimentos, pelo computador que salvou meu início de vida como professora e por sempre me trazer um chocolate para tornar a vida e seus percalços mais doces. Você é exemplo de dedicação e vitória!!

Ao Dr. Paulo Costa Carvalho pela construção do banco de dados específico de *Loxosceles*.

Ao Dr. Luis Eduardo Rizzo de Souza, por ter aceitado colaborar com o desenvolvimento dos experimentos de proteômica, pela paciência em me ensinar, pela dedicação aos nossos experimentos e pela seriedade com que os conduziu.

Aos professores Dr. Eládio O. F. Sanchez, Dr. Stênio P. Fragoso, Dr. Rafael B. da Silveira e Dr. Fabrício K. Marchini por terem aceitado prontamente em fazer parte da banca examinadora dessa tese.

Ao Dr. Rafael B. da Silveira, que com seu trabalho de doutorado e dedicação à ciência, possibilitou a existência desse e demais trabalhos do LME. Agradeço principalmente pela dedicação às metaloproteases e pelos esclarecimentos de dúvidas e por todas as sugestões.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Paraná, em especial à Msc Isolete Pauli e ao Prof. Dr. João Minoso, por contribuir com o desenvolvimento desse trabalho e nos conceder os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*.

Às minhas queridas amigas: Luciane Souza, Fernanda Tanaka, Nathalia, Mariana Porsani, Maria Luiza Rodrigues e ao ótimo amigo Fábio Chimentão por

absolutamente todos os momentos, pela amizade de todos esses anos, por me incentivarem e por serem sempre ótimas companhias!!

A todos do laboratório de Neurobiologia, pelas trocas de reagentes, pelo empréstimo de equipamento, pela disponibilidade em ajudar e pelas discussões e sugestões.

Especialmente à minha amiga Dra. Marcia Helena Appel, por ser minha maior incentivadora na carreira científica, por ser exemplo de competência, pelos diversos conselhos e pela ótima convivência.

À Marlene, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao colegiado do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao Sr. Luiz e ao Sr. Sebastião (Tião), porteiros do Setor de Ciências Biológicas, por sempre me acolher com um alegre bom dia e pelo carinho de cuidar de todos do LME nas horas extras, sempre preocupados com nossa segurança.

À CAPES, Fundação Araucária, FAPESP, SETI, CNPq e familiares pelo apoio financeiro.

Ao povo brasileiro que financia a UFPR e torna possível a formação de muitos profissionais!!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

Sucesso é ir de fracasso em fracasso  
sem perder o entusiasmo. (Winston Churchil)

O jovem que quer ser cientista - e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor - tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente). (Newton Freire Maia)



## RESUMO

As picadas de aranhas-marrons (gênero *Loxosceles*) são responsáveis pelo desenvolvimento de lesões dermonecrotica com típico espalhamento gravitacional e/ou manifestações sistêmicas. O veneno loxoscélico é uma mistura complexa de toxinas, enriquecido com peptídeos e proteínas (5-40 kDa) com diferentes atividades biológicas. As metaloproteases já foram descritas no veneno de muitas espécies de *Loxosceles*. A caracterização de metaloprotease da família das astacinas em veneno de *L. intermedia* (LALP1) foi o primeiro relato de um membro da família das astacinas como componente de venenos animais. Recentemente, as proteases do tipo astacinas foram descritas como uma família gênica presente no veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. As atividades biológicas das astacinas loxoscélicas ainda são desconhecidas. Isso porque, a quantidade de veneno produzido por cada aranha é bastante reduzida e purificações das formas nativas apresentam baixo rendimento. A caracterização da atividade bioquímica da LALP1 foi possível após produção dessa proteína recombinante em modelo procariótico em corpos de inclusão, seguida de redobramento "in vitro". Porém, o rendimento de proteína recombinante ativa foi bastante baixo e não possibilitou ensaios biológicos "in vivo". O presente trabalho buscou a produção de formas solúveis e biologicamente ativas de astacinas recombinantes do veneno de *L. intermedia*. As astacinas recombinantes, nas diferentes cepas e condições testadas com vetor pET-14b, foram produzidas em corpos de inclusão. Foi possível obtenção de LALP1 solúvel com diferentes métodos de redobramento "in vitro" em quantidades que permitiriam avaliação "in vivo", porém; a toxina recombinante não apresentou atividade proteolítica. A LALP2 foi produzida com proteína de fusão SUMO e foi obtida na fração solúvel, mas não foi detectada atividade proteolítica. As predições das estruturas tridimensionais da LALP1 e LALP2 sugerem que existe interferência das etiquetas na porção N-terminal para obtenção das conformações nativas. Os resultados obtidos norteiam novos ensaios para produção de astacinas recombinantes em *E. coli* com clivagem das etiquetas da porção N-terminal, construções em novos vetores contendo etiquetas na porção C-terminal ou ainda, produção das astacinas em sistemas eucarióticos. Outro objetivo do presente trabalho foi a avaliação do conteúdo de astacinas nativas nos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. A complexidade dos venenos das três espécies foi avaliada por géis bidimensionais e estes demonstraram a prevalência de proteínas de baixa mobilidade eletroforética (30-35kDa). O subproteoma de proteases do tipo astacina foi avaliado por imunoenaios 2-D com anticorpos anti-LALP1 e com zimogramas 2-D de gelatina. As análises dos subproteomas sugerem a existência de mais isoformas de astacinas do que as já descritas. Com análises por espectrometria de massas dos spots de interesse do veneno de *L. intermedia* foi possível identificação de um spot referente à LALP2. As dificuldades na identificação de mais spots podem estar relacionadas à glicosilação de alta manose identificada nos ensaios de *lectin blotting* com lectina GNA. Portanto, para melhorar as identificações tentaremos deglicosilar as proteínas do veneno ou ainda utilizaremos novas estratégias de identificação, como sequenciamento "de novo".

Palavras-chave: *Loxosceles*, aranhas-marrons, metaloproteases, astacinas, toxinas recombinantes, veneno, proteômica.

## ABSTRACT

Brown spider bites (*Loxosceles* genus) generate dermonecrotic lesions with gravitational spreading and/or systemic manifestations. *Loxosceles* venom is a complex mixture of toxins, enriched with peptides and proteins (5-40 kDa) which show distinct biological activities. Metalloproteases have already been described in the venom of different *Loxosceles* species.

Characterization of a metalloprotease from astacin family in the venom of *L. intermedia* (LALP1) was the first report of an astacin family member as component of animal venoms. Recently, astacin-like proteases were described as a family of toxins found in the venom of *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Biological activities of astacins from *Loxosceles* are unknown. The quantity of venom produced by each spider is minute and purification procedures result in low yield. Characterization of LALP1 biochemistry activity was performed after its recombinant production in a prokaryotic system as inclusion bodies, followed by refolding in vitro. However, yield of recombinant active protein was very low and it was not possible to perform biological assays. The present work aimed the production of recombinant soluble and active forms of astacins from *L. intermedia* venom. Although the recombinant astacins were produced in inclusion bodies in all tested conditions with different strains using pET-14b vector. LALP1 was refolded by different protocols of refolding in vitro, in quantities that would allow in vivo evaluation, though; recombinant toxins did not show proteolytic activity. LALP2 was produced as a fusion protein with SUMO and the recombinant protein was found in the soluble fraction, but there was no proteolytic activity. LALP1 and LALP2 structural predictions suggest that tags in the N-terminal position can interfere at native conformations. Results obtained herein conduct to new protocols of recombinant astacin production in *E. coli*, with removal of N-terminal tags, new constructions using other vectors with C-terminal tags, or even, production in eukaryotic systems. Other goal of this study was evaluation of native astacins in *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* venoms. Venom complexity was analyzed by bidimensional electrophoresis, which showed prevalence of proteins at 30-35kDa range. The subproteoma of astacin-like proteases was evaluated with 2-DE immunoblotting revealed by anti-LALP1 antibodies and 2-DE zymography assays. Subproteoma profiles suggest that there are more astacin isoforms than the ones already described. Using mass spectrometry analysis of *L. intermedia* venom spots, LALP2 was identified. The issues for identification of more *Loxosceles* astacins may be due to high mannose glycosylation, which was detected by lectin blotting with GNA lectin. Therefore, a deglycosylation protocol or a new strategy (*de novo* sequencing) is going to be performed for the improvement of astacin identifications.

**Keywords:** *Loxosceles*, brown spider, metalloproteases, astacins, recombinant toxins, venom, proteomic analysis.

## LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS DAS ARANHAS-MARRONS.....	28
FIGURA 2 - EVOLUÇÃO DE LESÃO CUTÂNEA DESENCADEADA POR PICADA DE ARANHA-MARROM – <i>Loxosceles reclusa</i> .....	31
FIGURA 3 - LOXOSCELISMO CUTÂNEO EM PACIENTE APÓS PICADA POR <i>Loxosceles</i> (ESPÉCIE NÃO IDENTIFICADA).....	32
FIGURA 4 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS COMPONENTES PROTÉICOS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	35
FIGURA 5 - ATIVIDADE METALOPROTEÁSICA DO VENENO DE <i>L.</i> <i>intermedia</i> : COMPARAÇÃO DE EXTRATO DE GLÂNDULAS E VENENO OBTIDO POR ELETROCHOQUE.....	41
FIGURA 6 - SEQUENCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DA LALP1.....	42
FIGURA 7 - DESENHO ESQUEMÁTICO DO SÍTIO CATALÍTICO E DA VOLTA DE METIONINA DAS METZINCINAS.....	43
FIGURA 8 - CARACTERÍSTICAS DAS SEQUENCIAS AMINOACÍDICAS DAS LALPs MADURAS.....	47
FIGURA 9 - EFEITO DA LALP SOBRE CÉLULAS SUBENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO.....	48
FIGURA 10 - SEQUENCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DEDUZIDA DA LALP2.....	66
FIGURA 11 - TESTES DE EXPRESSÃO DA LAP1 EM SHuffle T7 Express Lys Y.....	67

FIGURA 12 - TESTES DE EXPRESSÃO DA LALP2 EM SHuffle T7 Express Lys Y.....	67
FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA LALP1 E LALP2 EM SHuffle T7 Express Lys Y.....	68
FIGURA 14 - AVALIAÇÃO DO TESTE DE SUPEREXPRESSÃO DA LALP1..	70
FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DA OVEREXPRESSÃO EM LARGA ESCALA.....	71
FIGURA 16 - FRAÇÕES PURIFICADAS APÓS REDOBRAMENTO EM RESINA Ni <sup>2+</sup> -NTA AGAROSE.....	72
FIGURA 17 - ZIMOGRAMA DE GELATINA DA LALP1 APÓS REDOBRAMENTO EM COLUNA.....	72
FIGURA 18 - CINÉTICA DE AUTODEGRADAÇÃO DA LALP1.....	73
FIGURA 19 - TESTE DE DEGRADAÇÃO DE FIBROGÊNIO PELA AÇÃO DA LALP1.....	73
FIGURA 20 - TESTE DE DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA PELA AÇÃO DA LALP1.....	73
FIGURA 21 - PCR DE MODIFICAÇÃO DO CDNA DA LALP1 E LALP2 COM <i>Pfu</i> DNA POLIMERASE.....	78
.	
FIGURA 22 - PCR DE COLÔNIA APÓS TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS <i>E. coli</i> Mach1 QUIMIOCOMPETENTES COM PRODUTO DE LIGAÇÃO LALP1/pET-SUMO E LALP2/pET-SUMO.....	79
FIGURA 23 - TESTES DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DA SUMO/LALP2.....	81

FIGURA 24 - EXPRESSÃO DA SUMO/LALP2 EM LARGA ESCALA.....	82
FIGURA 25 - ANÁLISE EM SDS-PAGE DA PURIFICAÇÃO DA SUMO/LALP2 EM Ni <sup>2+</sup> -NTA AGAROSE.....	82
FIGURA 26 - ANÁLISE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS POR “WESTERN BLOTTING” .....	83
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA SUMO/LALP2.....	84
FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA SUMO/LALP2.....	84
FIGURA 29 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LALP1....	86
FIGURA 30 - PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LALP2....	87
FIGURA 31 - PERFIL PROTEICO BIDIMENSIONAL DOS VENENOS de <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> .....	103
FIGURA 32 - IMUNOREAÇÕES DOS VENENOS de <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> COM ANTICORPOS QUE RECONHECEM A LALP1.....	105
FIGURA 33 - ZIMOGRAMA DE GELATINA DOS VENENOS DE <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> .....	106
FIGURA 34 - PERFIL PROTÉICO DO VENENOS DE <i>L. intermedia</i> APÓS FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM FITAS DE pH 3-10.....	109
FIGURA 35 - PERFIL PROTÉICO DO VENENOS DE <i>L. intermedia</i> APÓS FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM FITAS DE pH 6-11.....	110

FIGURA 36 - IMUNOREAÇÃO DO VENENO de <i>L. intermedia</i> COM ANTICORPOS QUE RECONHECEM A LALP1 E ZIMOGRAMA DE GELATINA APÓS FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM FITAS DE pH 6-11.....	111
FIGURA 37 - ESPECTROS DE MASSA DE PEPTÍDEOS TRÍPTICOS DE SPOTS DE INTERESSE DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	112
FIGURA 38 - PERFIL PROTÉICO DE AMOSTRAS DE 200 µg DE VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	114
FIGURA 39 - ESPECTROS DE MASSA DE PEPTÍDEOS TRÍPTICOS DE SPOTS DE INTERESSE DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> .....	115
FIGURA 40 - BLOTTING COM LECTINA GNA.....	117

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: PERCENTUAL DE CADA GRUPO DE TOXINA DENTRE O TOTAL DE TRANSCRITOS QUE CODIFICAM TOXINAS PRESENTES NAS GLÂNDULAS PRODUTORAS DE VENENO DE *L. intermedia*.....36

GRÁFICO 2: CONDIÇÕES DE TAMPÃO TESTADAS PARA REDOBRAMENTO “IN VITRO” POR DILUIÇÃO RÁPIDA.....76

GRÁFICO 3: MONITORAMENTO DA PURIFICAÇÃO DA SUMO/LALP2 EM Ni<sup>2+</sup>-NTA AGAROSE.....82

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: NÚMERO DE ACIDENTES COM ARANHAS DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> .....	30
TABELA 2: PORCENTAGEM DE IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE MEMBROS DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS.....	46
TABELA 3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA SUBCLONAGEM DAS ISOFORMAS DE ASTACINAS DO VENENO DE <i>L. intermedia</i> EM VETOR pET-SUMO.....	57



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>28</b>
2.1 ARANHAS- MARRONS (GÊNERO <i>Loxosceles</i> ): CARACTERÍSTICAS, TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	28
2.2 LOXOSCELISMO.....	29
2.2.1 Epidemiologia.....	29
2.2.2 Quadros clínicos: cutâneo e sistêmico.....	29
2.2.3 Diagnóstico e Tratamento.....	33
2.3 VENENO DE <i>Loxosceles</i> .....	35
2.3.1 Peptídeos inseticidas.....	37
2.3.2 Fosfolipases-D.....	37
2.3.3 Serinoproteases.....	38
2.3.4 Hialuronidases.....	39
2.3.5 TCTP.....	39
2.3.6 Alérgenos.....	40
2.3.7 Metaloproteases.....	40

2.3.7.1 Caracterização de metaloproteases em veneno de <i>Loxosceles</i> spp.....	41
2.3.7.2 Família das astacinas.....	43
2.3.7.3 Astacinas loxoscélicas.....	45
2.4 APLICAÇÕES DE TOXINAS LOXOSCÉLICAS.....	48
<b>3. CAPÍTULO I - Obtenção de astacinas recombinantes do veneno de <i>L. intermedia</i>: expressão em modelo procariótico e redobramento “in vitro”</b>	
<b>3.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
3.2.1 OBJETIVO GERAL .....	54
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
<b>3.3 MATERIAIS e MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
3.3.1 REAGENTES.....	55
3.3.2 OBTENÇÃO DAS ASTACINAS RECOMBINANTES EM SISTEMA PROCARIÓTICO ( <i>E. coli</i> ).....	55
3.3.2.1 Subclonagem dos cDNA em vetor de expressão pET-SUMO.....	55
3.3.2.2 Testes de expressão e solubilidade das astacinas recombinantes.....	57
3.3.2.3 Expressão das astacinas recombinantes em larga escala em vetor pET-SUMO.....	59
3.3.2.4 Cromatografia de afinidade em resina Ni <sup>2+</sup> -NTA agarose .....	60

3.3.2.5 Redobrimento “in vitro” da astacinas recombinantes superexpressas em cepas de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	60
3.3.2.5.1 Superexpressão da LALP1 e LALP2.....	60
3.3.2.5.2 Redobrimento “in vitro” em coluna Ni <sup>2+</sup> -NTA agarose.....	61
3.3.2.5.3 Redobrimento “in vitro” por diluição rápida.....	62
3.3.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	63
3.3.4 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	64
3.3.5 ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO (“WESTERN BLOTTING”).....	64
3.3.6 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE FIBRONECTINA E FIBRINOGENIO.....	64
3.3.7 ENSAIOS DE ZIMOGRAMA.....	65
3.3.8 ENSAIOS DE AUTODEGRADAÇÃO.....	65
3.3.9 PREDIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DA LALP1 E LALP2.....	65
<b>3.4 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
3.4.1 TRANSFORMAÇÃO DE CEPAS DE <i>E. coli</i> E OTIMIZAÇÃO DE EXPRESSÃO NA FRAÇÃO SOLÚVEL DA LALP1 E LALP2 EM pET-14b.....	66
3.4.2 REDOBRAMENTO “IN VITRO”.....	68
3.4.2.1 Redobrimento em resina Ni <sup>2+</sup> -NTA agarose.....	68

3.4.2.2 Redobramento por diluição rápida.....	74
3.4.3 SUBCLONAGEM E OBTENÇÃO DAS ASTACINAS RECOMBINANTES UTILIZANDO VETOR DE EXPRESSÃO pET-SUMO.....	77
<b>3.5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>4 CAPÍTULO II - Subproteoma de proteases do tipo astacina presentes no veneno de três espécies de <i>Loxosceles</i> (aranha-marrom).....</b>	<b>94</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>4.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>96</b>
4.2.1 OBJETIVO GERAL.....	96
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	96
<b>4.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>97</b>
4.3.1 REAGENTES.....	97
4.3.2 OBTENÇÃO DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS.....	97
4.3.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	97
4.3.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL.....	97
4.3.5 SUBPROTEOMA DE ASTACINAS DOS VENENOS DE <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> e <i>L. gaucho</i> .....	98
4.3.5.1 “Imunoblotting” bidimensional.....	98
4.3.5.2 Zimograma bidimensional.....	98

4.3.6 “IMMUNOBLOTTING” COM LECTINAS.....	100
4.3.8 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	100
<b>4.4 RESULTADOS.....</b>	<b>102</b>
4.3.1 PERFIL 2-D DOS VENENOS DE <i>L. intermedia</i> , <i>L. laeta</i> E <i>L. gaucha</i> ...	102
4.3.2 ANÁLISE DO SUBPROTEOMA DE ASTACINAS DOS VENENOS DE <i>L. intermdia</i> , <i>L. laeta</i> E <i>L. gaucha</i> : IMUNOENSAIOS E ZIMOGRAMAS.....	104
4.3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ASTACINAS.....	107
4.3.4 IDENTIFICAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS.....	116
<b>4.5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>118</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>122</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>124</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>144</b>
ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	144
ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	145
HISTÓRICO ESCOLAR.....	146
AUTORIZAÇÃO DO IBAMA.....	147
PARECER TÉCNICO DO CTNBIO.....	148

## CAPÍTULO 1

---

**Obtenção de astacinas recombinantes do veneno de *L. intermedia*: expressão em modelo procariótico, redobramento *in vitro* e avaliação de atividade proteolítica**

## 1 INTRODUÇÃO

As aranhas-marrons são aracnídeos do Gênero *Loxosceles* com grande número de espécies amplamente distribuídas no globo terrestre, exceto no continente antártico (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004). No Brasil já foram descritas 10 espécies (PLATNICK, 2008) e 4 são encontradas no estado do Paraná - *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. gauch*o e *L. hirsuta*. As três espécies de maior importância médica são *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gauch*o, sendo que a *L. intermedia* é a espécie mais abundante no estado e principalmente na Cidade de Curitiba e Região Metropolitana (Malaque *et al.*, 2002). Acidentes com aranhas-marrons caracterizam-se como um problema de saúde pública no Estado do Paraná, com número médio de 5.417 acidentes por ano (notificações dos últimos cinco anos - 2007 a 2011 - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL, 2012). Os quadros clínicos desencadeados em acidentes com humanos são genericamente denominados loxoscelismo e podem se manifestar por duas variantes distintas: quadro cutâneo e quadro sistêmico (Futrell, 1992). É sabido que o desenvolvimento de um quadro clínico e/ou outro está relacionado tanto com características da aranha que causou o acidente (idade e tempo sem alimentação, sexo e quantidade de veneno inoculado) quanto do acidentado (idade, condição imunológica, região da picada, estado nutricional, tempo de demora para procurar tratamento adequado)(Barbaro *et al.*, 1996; Vetter e Bush, 2002). O loxoscelismo cutâneo ocorre na grande maioria dos acidentados sendo caracterizado por lesão dermonecrotica com típico espalhamento gravitacional a partir do ponto de inoculação do veneno. A gravidade da lesão varia de indivíduo para indivíduo e em casos extremos é necessária cirurgia para retirada do tecido necrosado seguida de cirurgias reparadoras da região (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004). O loxoscelismo sistêmico ocorre com menor frequência, porém no geral é de maior gravidade, pois pode evoluir até para o óbito do acidentado. As manifestações do quadro sistêmico incluem hemólise intravascular, agregação plaquetária, toxicidade hepática e falência renal aguda (Futrell, 1992; Lung e Mallory, 2000; Da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2006; De Oliveira-Christoff *et al.*, 2008; Malaque *et al.*, 2011).

O veneno das aranhas-marrons é um líquido transparente constituído por muitos compostos biologicamente ativos responsáveis pelo desenvolvimento dos sinais e sintomas do loxoscelismo (Da Silva *et al.*, 2004). As proteínas do veneno

loxoscélicas são produzidas por um par de glândulas presentes no cefalotórax das aranhas e são secretadas no momento da inoculação do veneno (Dos Santos *et al.*, 2000). Estudos iniciais dos componentes dos venenos loxoscélicos mostraram que o perfil protéico é caracterizado por uma predominância de proteínas de baixa massa molecular (3-45kDa) (Norment *et al.*, 1979; Barbaro *et al.*, 1992; Veiga *et al.*, 2000a). São descritos como componentes dos venenos loxoscélicos: peptídeos inseticidas, metaloproteases do tipo astacinas, fosfolipases-D, neurotoxinas, serinoproteases, proteínas tumorais controladas traducionalmente (TCTPs), alérgenos, hialuronidases e inibidores de serinoproteases (Da Silva *et al.*, 2004; De Castro *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2010). Com base nas análises dos transcriptomas das glândulas de veneno de *L. laeta* e de *L. intermedia*, os transcritos de toxinas mais abundantes nesses venenos são: peptídeos inseticidas (22,8% do total dos transcritos), fosfolipases-D (9% a 16% do total dos transcritos) e metaloproteases do tipo astacinas (cerca de 9% do total de transcritos) (Fernandes-Pedrosa Mde *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010).

As metaloproteases dos venenos loxoscélicos foram primeiramente descritas a partir da identificação da atividade proteolítica dependente de metal em ensaios com veneno total de *L. reclusa* (Eskafi e Norment, 1976). Posteriormente, foi demonstrado que tanto o veneno total de *L. intermedia* obtido por eletroestimulação quanto o extrato de glândulas de veneno de *L. intermedia* apresentam atividade proteolítica frente à fibronectina, ao fibrinogênio e ao colágeno desnaturado (gelatina) e que tais atividades são inibidas quando utilizados compostos quelantes de metais divalente (1-10 fenantrolina e EDTA) (Feitosa *et al.*, 1998; Da Silveira *et al.*, 2002). Além da identificação de atividade proteolítica nos venenos de *L. reclusa* e *L. intermedia*, essa propriedade foi também descrita nos venenos de *L. rufescens* (Young e Pincus, 2001) e *L. deserta* (Barbaro *et al.*, 2005). Os principais alvos das metaloproteases loxoscélicas são componentes de matriz extracelular como demonstrado para o veneno de *L. intermedia* que é capaz de degradar entactina, gelatina (colágeno desnaturado) e um proteoglicano de heparan sulfato, bem como, moléculas solúveis do plasma como o fibrinogênio e a fibronectina (Veiga *et al.*, 2000b; Veiga *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2002).

Utilizando técnicas de clonagem molecular e comparação de sequências codificantes, estudos mais recentes mostraram que metaloproteases identificadas



nas glândulas de veneno de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* são membros da família das astacinas e foram denominadas “*Loxosceles* Astacin-Like Proteases” (LALPs). Através da análise de uma biblioteca de cDNA das glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia* foram identificadas transcritos para três isoformas de astacinas (LALP1, LALP2 e LALP3). Foram também descritos um transcrito identificados através de reações de RT-PCR para astacina em *L. laeta* (LALP4) e um em *L. gaucho* (LALP5). Essas identificações caracterizam as metaloproteases do tipo astacina como uma família de toxinas intra e interespecie o que sugere a presença dessas moléculas em venenos de todo o gênero loxoscélico (Da Silveira *et al.*, 2007c; Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

As astacinas são proteases dependentes de zinco encontradas em um grande número de organismos (bactérias, invertebrados e vertebrados) desempenhando as mais diversas atividades biológicas (Bond e Beynon, 1995; Mohrlen *et al.*, 2004). A enzima protótipo da família das astacinas é uma protease identificada no suco gástrico do lagostim *Astacus astacus* descrita com função digestiva (Dumermuth *et al.*, 1991; Stocker *et al.*, 1995). As astacinas estão também envolvidas em outros eventos fisiológicos tais como morfogênese, ecdise, eclosão de ovos, processamento de peptídeos biologicamente ativos, processamento de moléculas extracelulares, formação de padrões em embriões e ativação de fatores de crescimento (Bond e Beynon, 1995; Stocker *et al.*, 1995). Dentre todas essas atividades descritas para as proteases da família das astacinas, pouco se sabe a respeito da atividade das astacinas loxoscélicas. Ensaio de degradação com a LALP1 recombinante obtida por “refolding” “in vitro” após expressão em células de bactérias (*Escherichia coli*) caracterizaram atividade gelatinolítica, fibrogenolítica e fibronectinolítica (Da Silveira *et al.*, 2007c) corroborando com estudos anteriores com veneno total de *L. intermedia* (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000b; Da Silveira *et al.*, 2002). Após tratamento de células subendoteliais de aorta de coelho com a LALP1, foi observada citotoxicidade dependente do tempo evidenciada por desadesão das células do substrato, alterações morfológicas e presença de debris celulares (Da Silveira *et al.*, 2007c).

A compilação dos dados dos estudos dos transcriptomas de glândulas de veneno de *L. intermedia* e de *L. laeta* e de informações sobre atividades biológicas das toxinas, sugere-se que os venenos loxoscélicos são compostos por uma

diversidade de isoformas de astacinas. Adicionalmente, essas observações indicam que essas enzimas desempenham funções importantes para a biologia das aranhas-marrons e também tenham grande participação nos eventos tóxicos do loxoscelismo. Porém, essas hipóteses ainda precisam ser comprovadas, uma vez que os dados dos transcriptomas e de clonagem molecular se baseiam em sequências de mRNAs e, portanto; são informações apenas dos transcritos das glândulas de venenos os quais podem sofrer diferentes processamentos e até mesmo serem degradados antes de serem traduzidos.

Frente a essa problemática, no intuito de avaliar a representatividade das astacinas nativas dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, analisamos o subproteoma das astacinas desses venenos. Além disso, buscamos a obtenção de astacinas recombinantes do veneno de *L. intermedia* (LALP1 e LALP2) solúveis e biologicamente ativas para estudos das suas funcionalidades biológicas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aranhas-marrons (Gênero *Loxosceles*): características, taxonomia e distribuição geográfica

As aranhas-marrons são aracnídeos pequenos com tamanho corporal de 8 a 15 mm e suas pernas podem chegar a medir 30 mm (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004). Essas aranhas apresentam dimorfismo sexual, sendo o corpo das fêmeas maior e pernas menores que as dos machos (Figura 1A) (Chaim *et al.*, 2011b).

Aranhas-marrons e aranhas-violino são os nomes populares que designam as aranhas do Gênero *Loxosceles* uma vez que elas apresentam coloração marrom (claro a escuro) e possuem uma marca semelhante a um violino na região dorsal do cefalotórax (prosoma do animal) (Figura 1B) (Futrell, 1992; Vetter e Visscher, 1998). Além dessas duas características, as aranhas-marrons podem ser diferenciadas das demais por possuírem três pares de olhos organizados em semicírculo na região frontal do cefalotórax (Figura 1B) (Vetter e Visscher, 1998; Da Silva *et al.*, 2004; Swanson e Vetter, 2006; Cabrerizo *et al.*, 2009).

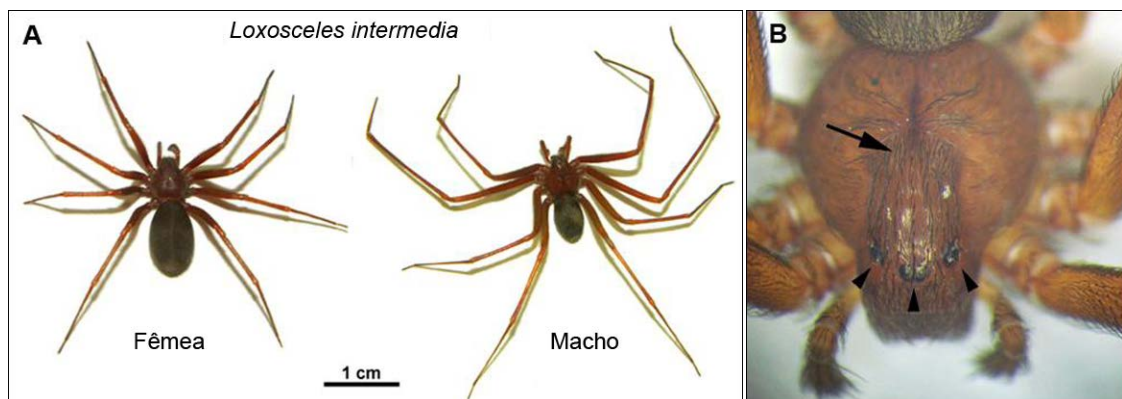


FIGURA 1: CARACTERÍSTICAS DAS ARANHAS-MARRONS. A – Dimorfismo sexual de *L. intermedia*. Fêmea com corpo maior e pernas menores que as do macho. B – Em destaque o desenho de violino no cefalotórax indicado pela seta e os três pares de olhos distribuídos em semicírculo indicados com as pontas de setas. ADAPTADO DE: Chaim *et al.*, 2011b.

Essas aranhas são lucífugas, possuem hábitos noturnos, podem viver de 3 a 7 anos e em habitat natural podem ser encontradas embaixo de pedras, troncos de árvores e restos vegetais (Futrell, 1992; Andrade *et al.*, 1999; Da Silva *et al.*, 2004). Apresentam grande capacidade de adaptação, são capazes de se reproduzir com facilidade mesmo em condições desfavoráveis, podendo ficar longos períodos sem água e sem comida. Além disso, suportam grandes variações de temperatura (8 a

43°C). Ao longo dos anos, as aranhas-marrons adquiriram hábitos intradomiciliares, onde são encontradas atrás de quadros, entre livros, no meio de roupas, calçados e outros objetos (Futrell, 1992). As aranhas-marrons são artrópodes sedentários, não agressivos, e carnívoros, que se alimentam de pequenos insetos, principalmente, traças, baratas, moscas, mosquitos e cupins (Futrell, 1992).

Taxonomicamente, as aranhas-marrons pertencem ao Gênero *Loxosceles*, à Família Sicariidae, à Sub-ordem Labidognatha, à Ordem Aranea, à Classe Arachnida e ao Filo Arthropoda (PLATNICK, 2008). Espécies do Gênero *Loxosceles* estão mundialmente distribuídas em regiões temperadas e tropicais (Hogan *et al.*, 2004). Já foram descritas mais de 100 espécies em diferentes países da Europa, África, Oceania, Ásia, América do Norte, Central e, principalmente, América do Sul (Da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2011b)(GERTSCH, 1967; PLATNICK, 2008). As espécies de importância médica variam nas diferentes Américas. Na América do Norte, as espécies de maior importância são *L. deserta* e *L. reclusa*. Na América do Sul, três espécies de *Loxosceles* são descritas como responsáveis pela maioria dos acidentes: *L. laeta*, distribuída em toda a América do sul; *L. intermedia*, presente no Brasil e na Argentina; e *L. gaucho* endêmica do Brasil (Barbaro *et al.*, 2005; Isbister e Fan, 2011). Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, essas três espécies são predominantes (Sezerino *et al.*, 1998; Malaque *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2004), sendo a espécie *L. intermedia* com maior distribuição no estado do Paraná e a principal espécie relacionada com acidentes no município de Curitiba (Marques-Da-Silva e Fischer, 2005).

## 2.2 Loxoscelismo

### 2.2.1 Epidemiologia

Na década de 90, ocorreu um grande aumento de notificações de acidentes com aranhas do Gênero *Loxosceles* no Brasil, os quais passaram a ser considerados um problema de saúde pública (Sezerino *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 2004). Os acidentes geralmente acontecem nos meses mais quentes do ano, com a maioria dos casos registrados nos meses de outubro a março ou setembro a fevereiro (Sezerino *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2011b). Como as aranhas-marrons não são agressivas, os acidentes acontecem devido ao reflexo de

defesa das aranhas quando são comprimidas por um indivíduo durante atividades diárias de vestir-se, calçar-se ou até mesmo durante o sono (Sezerino *et al.*, 1998; Malaque *et al.*, 2002).

O loxoscelismo, termo utilizado para designar sinais e sintomas do envenenamento de humanos decorrente da picada por aranhas-marrons, é mais frequente na região Sul do Brasil. Na cidade de Curitiba e Região Metropolitana, são registrados em média 2000 casos de loxoscelismo por ano (TABELA 1). Nos últimos 5 anos (2007 a 2011) foram registrados 42.174 acidentes com Loxoceles no Brasil, sendo que 64,2% desses acidentes ocorreram no estado do Paraná (26.334) e do total do país, 32,5% foram registrados em Curitiba (13.700) (TABELA 1, Sistema Nacional de Notificações e Agravos - SINAN, 2012).

<b>Acidentes <i>Loxosceles</i></b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>Total de acidentes (últimos 5 anos)</b>	<b>Percentual</b>
<b>Brasil</b>	9.353	8.065	8.535	8.059	8.162	42.174	100%
<b>Paraná</b>	6.511	5.391	5.625	4.704	4.103	26.334	64.2%
<b>Curitiba</b>	3.722	2.882	2.926	2.266	1.904	13.7	32.5%

TABELA 1: NÚMERO DE ACIDENTES COM ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles* - SINAM

### 2.2.2 Quadros clínicos: cutâneo e sistêmico

O quadro de envenenamento após acidentes com aranhas-marrons pode evoluir para duas variantes clínicas distintas: o quadro clínico cutâneo ou dermonecrotico e o quadro clínico viscerocutâneo ou sistêmico (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004; Chaim *et al.*, 2011b; Malaque *et al.*, 2011). Muitos fatores estão relacionados com a severidade dos quadros clínicos desencadeados pelos indivíduos acidentados, tanto fatores relacionados ao acidentado (estado nutricional, idade, local da picada, tempo de demora para procurar tratamento adequado) quanto às características da aranha que o picou (espécie, estágio de desenvolvimento, sexo, quantidade de veneno inoculada) (Gajardo-Tobar, 1966;

Schenone *et al.*, 1989; Barbaro *et al.*, 1994; Sezerino *et al.*, 1998; Andrade *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 1999).

O quadro clínico cutâneo é inicialmente caracterizado por um ponto avermelhado no local da inoculação do veneno que evolui para uma lesão dermonecrótica com típico espalhamento gravitacional. O estabelecimento da lesão varia de 12 a 48h após o acidente (Figura 2). (Futrell, 1992; Appel *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2007; Isbister e Fan, 2011).



FIGURA 2: EVOLUÇÃO DE LESÃO CUTÂNEA DESENCADEADA POR PICADA DE ARANHA-MARROM – *Loxosceles reclusa*. Paciente de 53 anos diagnosticado com loxoscelismo cutâneo. A – Lesão inicial, típica de picada de aranhas do Gênero *Loxosceles*, com eritema e regiões isquêmicas (placa marmórea) e típico espalhamento gravitacional. B – Lesão dermonecrótica após aproximadamente 1 mês de tratamentos não efetivos, circundada com halo isquêmico e eritema. C – Pressão negativa utilizada como terapia alternativa. D – Tecido em fase final de cura e cicatrização após dois meses e meio da picada. ADAPTADO DE: Miller *et al.*, 2007.

A picada das aranhas-marrons é muito pouco dolorosa, e na maioria dos casos, passa despercebida pelo paciente. Porém, após 2 a 8 horas, a dor pode variar de moderada à severa e é descrita como dor local do tipo “queimação” ou ardência, podendo ser acompanhada por abscesso, pontos de hemorragia, prurido, edema e eritema, que variam de intensidade dependendo do tecido atingido (Futrell, 1992; Hogan *et al.*, 2004). Nesse momento, a lesão é denominada de placa marmórea por existirem regiões avermelhadas (eritema devido à dilatação dos

capilares) entremeadas com áreas pálidas devido à isquemia do tecido (Figura 3) (Hogan *et al.*, 2004).



FIGURA 3: LOXOSCELISMO CUTÂNEO EM PACIENTE APÓS PICADA POR *Loxosceles* (ESPÉCIE NÃO IDENTIFICADA). Homem de 26 anos com lesão cutânea. A seta preta indica o local da picada, as setas brancas abaixo indicam o espalhamento gravitacional da placa marmórea. Acima do ponto da picada são esquimoses com típica coloração violácea. ADAPTADO DE: De SOUZA *et al.* 2008.

A evolução da lesão por 3 a 7 dias pode gerar uma grande úlcera de difícil cicatrização e, em alguns casos, é necessário realizar cirurgia reparadora no local da lesão (Sezerino *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2005). Essa lesão pode ter como agente sinérgico, acentuando sua gravidade, a presença de microorganismos anaeróbios provenientes das quelíceras das aranhas, que os inoculam no momento da picada concomitantemente com o veneno. Um agente importante de infecção secundária à picada é o bacilo gram positivo *Clostridium perfringens* (Monteiro *et al.*, 2002). Outros sintomas manifestam-se juntamente com o quadro local, tais como: febre, dores de cabeça, prurido, petéquias, exantema, náuseas e vômitos (Da Silva *et al.*, 2004).

O quadro sistêmico é observado em 3 a 16% dos casos, e, embora seja menos comum que o quadro cutâneo, é a principal causa de morte relacionada ao envenenamento (Futrell, 1992; Lung e Mallory, 2000; Da Silva *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2005; Chaim *et al.*, 2006). Os sintomas desse quadro clínico geralmente iniciam 24 horas após a picada e são caracterizados por distúrbios da hemostase e da função renal (Da Silva *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2005; Malaque *et al.*, 2011). Nos casos mais graves ocorrem alterações no quadro hematológico, incluindo anemia hemolítica, trombocitopenia causada devido à agregação plaquetária e coagulação intravascular disseminada, além de ocorrer aumento da bilirrubina indireta, icterícia e falência renal aguda (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2004; Chaim

*et al.*, 2006). Outras consequências decorrentes do envenenamento incluem alterações vasculares nos pulmões, fígado e rins (Lung e Mallory, 2000; De Oliveira-Christoff *et al.*, 2008). Uma das alterações funcionais mais graves é a insuficiência renal aguda (IRA), a qual se caracteriza por hemoglobinúria e hematúria, e em casos extremos pode levar à obstrução da luz tubular (Wasserman e Anderson, 1983; Schenone *et al.*, 1989; Futrell, 1992; Sezerino *et al.*, 1998; Lung e Mallory, 2000; Kusma *et al.*, 2008). É descrito que o quadro mais frequente no loxoscelismo sistêmico é a presença de hemólise intravascular, sendo a insuficiência renal aguda mais rara e associada a um quadro de hemólise maciça (Malaque *et al.*, 2011).

### 2.2.3 Diagnóstico e Tratamento

O tratamento do loxoscelismo ainda é bastante controverso na literatura científica. O primeiro obstáculo para o tratamento do loxoscelismo reside nas dificuldades encontradas para realização de um diagnóstico correto. Poucas vezes o diagnóstico é realizado baseado na identificação da aranha, uma vez que a picada é indolor e raramente os acidentados percebem que foram picados e conseguem capturar a aranha (Da Silva *et al.*, 2004; Pauli *et al.*, 2006; Isbister e Fan, 2011). Na grande maioria dos casos, o diagnóstico é feito baseado nos sintomas apresentados pelo paciente e pela evolução da lesão. No entanto, o diagnóstico é dificultado porque o desenvolvimento do quadro clínico é semelhante a aproximadamente 40 diferentes condições patológicas que são erroneamente diagnosticadas como acidente loxoscélico (Swanson e Vetter, 2006; Vetter e Isbister, 2008; Vetter, 2011). Portanto, deve ser realizado diagnóstico diferencial para uma série de doenças como vasculite, infecções bacterianas, herpes, entre outras (Pauli *et al.*, 2006; Swanson e Vetter, 2006; Vetter, 2011). Uma vez que não existem ensaios laboratoriais específicos disponíveis comercialmente para o diagnóstico do Loxoscelismo, os parâmetros laboratoriais como hemoglobinúria, hemoglobina sérica, bilirrubina indireta, creatina quinase, entre outros, são essenciais para o diagnóstico e avaliação da severidade do envenenamento (Hogan *et al.*, 2004). O diagnóstico precoce da picada de aranha marrom pode evitar o desenvolvimento da lesão, mas após a evolução da dermonecrose, o tratamento é apenas sintomático (Appel *et al.*, 2005; Swanson e Vetter, 2006).



Diferentes terapias têm sido propostas, como utilização de dapsona, esteróides, tratamento com câmara hiberbárica de oxigênio, com pressão negativa e terapia com soro antiveneno (Hogan *et al.*, 2004). Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a utilização dos antivenenos no tratamento do loxoscelismo cutâneo como: soro anti-loxoscélico, IgG completa, fragmentos Fab ou F(ab)'2 (Gomez *et al.*, 1999; Isbister *et al.*, 2003; Olvera *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2006). PAULI e colaboradores (2009) mostraram que a utilização do soro anti-loxoscélico quando administrado nas primeiras 48 horas após o envenenamento tem grande poder terapêutico no quadro cutâneo. Apesar dos estudos serem somente em modelo animal e mais estudos serem necessários para avaliar as reais eficiências dos anti-venenos, tanto nos casos de loxoscelismo cutâneo quanto sistêmico, em países que já incluíram a soroterapia no protocolo de tratamento a mortalidade de crianças e jovens diminuiu (Isbister *et al.*, 2003; Pauli *et al.*, 2009).

O Ministério da Saúde brasileiro disponibiliza dois tipos de antivenenos produzidos em cavalos: soro anti-loxoscélico e o soro anti-aracnídico. O soro anti-loxoscélico é um soro poli-específico que contém anticorpos contra venenos de *L. laeta*, *L. intermedia* e *L. gauch* produzido no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos do Estado do Paraná (CPPI). O soro anti-aracnídico é um soro produzido com venenos de *Loxosceles gauch*, *Phoneutria nigriventer*, *Tityus serrulatus* e *Tityus bahiensis* (Pauli *et al.*, 2006). Apesar das recomendações do Ministério da Saúde para o uso da soroterapia no Brasil, como existe divergências na literatura científica em relação à eficácia dos soros em neutralizar os efeitos locais, à via de administração e ao tempo ideal para o início da administração, a porcentagem de uso é de apenas 11,9% no Paraná; 46,8% em Santa Catarina; 54,9% no Rio Grande do Sul e 70% em São Paulo (Pauli *et al.*, 2006; Vetter e Isbister, 2008).

A melhora na eficiência dos tratamentos do loxoscelismo está diretamente relacionada com a necessidade de melhor compreender a composição e, principalmente, os mecanismos de ação dos componentes do veneno loxoscélico (Paixao-Cavalcante *et al.*, 2007).

### 2.3 VENENO DE *Loxosceles*

O veneno loxocélico é um líquido cristalino composto por uma mistura complexa de várias moléculas biologicamente ativas (toxinas), produzidas por um par de glândulas situadas no cefalotórax, as quais são ligadas ao par de quelíceras das aranhas-marrons (Dos Santos *et al.*, 2000). Os efeitos tóxicos do veneno devem-se à ação sinérgica ou conjunta de todos os seus componentes (Geren *et al.*, 1976).

A composição dos venenos loxoscélicos não está totalmente esclarecida e muitos estudos estão contribuindo para a completa caracterização desses venenos. É consenso na literatura que a natureza do veneno é essencialmente protéica, contendo peptídeos, proteínas enzimáticas e não-enzimáticas. Análises de perfis protéicos do veneno de diferentes espécies de *Loxosceles* revelam a presença de poucas proteínas de alta massa eletroforética aparente (acima de 40 kDa) e uma predominância de proteínas de baixa massa (5-40 kDa) (Figura 4) (Veiga *et al.*, 2000a).

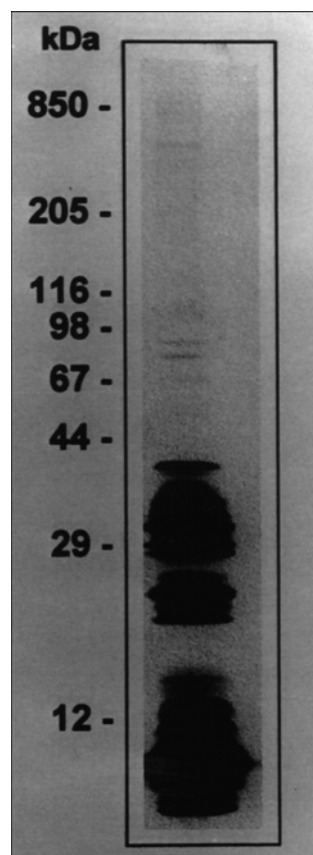


FIGURA 4: Perfil eletroforético dos componentes protéicos do veneno de *L. intermedia*. As proteínas de veneno total de *L. intermedia* foram separadas em gradiente linear contínuo de gel de poliacrilamida (3-20 %) em condições não redutoras e corados pelo método de prata monocromática. ADAPTADO DE: Veiga *et al.*, 2000.

Já foram descritas no veneno total atividades de fosfolipases-D, serinoproteases, hialuronidases, metaloproteases e peptídeos com atividade inseticida (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000a; Veiga *et al.*, 2000b; Veiga *et al.*, 2001; Young e Pincus, 2001; Da Silva *et al.*, 2004; De Castro *et al.*, 2004; Barbaro *et al.*, 2005; Da Silveira *et al.*, 2007c). Mais recentemente, análises dos transcritos presentes nas glândulas de veneno de espécimes de *L. intermedia* revelaram a existência de vários grupos de toxinas (Gráfico 1) (Gremski *et al.*, 2010).

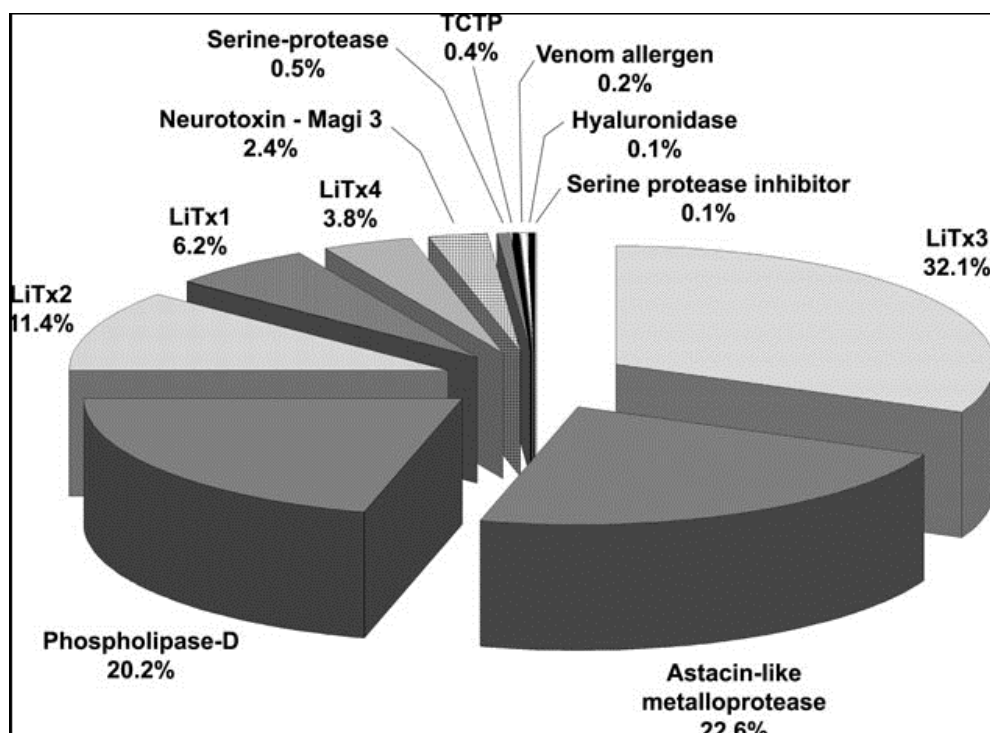


GRÁFICO 1: Percentual de cada grupo de toxina dentro o total de transcritos que codificam toxinas presentes nas glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia*. ADAPTADO DE: Gremski *et al.*, 2010.

Além das toxinas citadas acima, foram identificados transcritos semelhantes às neurotoxinas, às notinas, aos alérgenos e à proteína tumoral controlada traducionalmente (TCTP). As toxinas altamente expressas em veneno de *L. intermedia* são: peptídeos potencialmente inseticidas (LiTx e semelhantes à Magi 3 - 55,9% dos transcritos de toxinas), metaloproteases do tipo astacinas (22,6%) e fosfolipases-D (20,2%). Já as hialuronidases, serinoproteases, TCTP e alérgenos são pouco expressas e em conjunto não chegam a 1,5% do total de transcritos referentes a toxinas (Gremski *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Peptídeos inseticidas

A maioria das toxinas inseticidas encontradas nos venenos de aranhas, escorpiões e até mesmo em plantas são peptídeos com baixa massa molecular, variando de 2 a 12 kDa (Dong, 2007). É descrito que os venenos de aranhas apresentam uma maior concentração desses peptídeos do que os venenos de escorpiões (Escoubas *et al.*, 2000). Essas toxinas são classificadas de acordo com o seu modo de ação: elas podem afetar a transmissão glutamatérgica de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), de sódio ( $\text{Na}^{+}$ ), de potássio ( $\text{K}^{+}$ ) e de cloreto ( $\text{Cl}^{-}$ ). Algumas toxinas podem estimular a liberação dos neurotransmissores e outras podem bloquear os receptores colinérgicos pós-sinápticos (Rash e Hodgson, 2002).

No veneno de *L. intermedia*, foram caracterizadas pelo menos três toxinas com propriedades inseticidas, denominadas LiTx 1, LiTx 2 e LiTx 3 (De Castro *et al.*, 2004). Essas toxinas possuem de 53 a 69 resíduos de aminoácidos, com vários resíduos de cisteínas e após purificação do veneno total por técnicas cromatográficas, apresentaram atividade inseticida em larvas de insetos. Porém, não foram descritos os mecanismos de ação dessas toxinas e nem os canais de íons em que esses peptídeos inseticidas atuam (De Castro *et al.*, 2004).

### 2.3.2 Fosfolipases-D

As fosfolipases-D são as toxinas mais estudadas dos venenos loxoscélicos e melhor caracterizadas do ponto de vista bioquímico e biológico. Muitos estudos mostram que essas enzimas são capazes de induzir experimentalmente dermonecrose, resposta inflamatória, agregação plaquetária, hemólise, aumento da permeabilidade vascular, nefrotoxicidade, letalidade em camundongos e efeitos citotóxicos em linhagens celulares estabelecidas (Futrell, 1992; Da Silva *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2005; Chaim *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2007b; Ribeiro *et al.*, 2007; Appel *et al.*, 2008). Portanto, fosfolipases-D isoladas (nativas ou variantes recombinantes) induzem a maioria dos efeitos tóxicos desencadeados pelo veneno total (mistura de toxinas). As enzimas dermonecróticas foram por muitos anos denominadas de esfingomielinases-D, embora hidrolizem preferencialmente esfingomielina, foi identificado um amplo espectro de fosfolipídeos como substratos dessas toxinas, mostrando que a denominação de fosfolipases-D é bioquimicamente a mais correta (Lee e Lynch, 2005; Chaim *et al.*, 2011a). Os

mecanismos de ação das fosfolipases-D ainda não foram totalmente esclarecidos, mas estudos comparativos com isoforma original e mutada de fosfolipases-D recombinantes de *L. intermedia* (LiRecDTs – “*Loxosceles intermedia* recombinant dermonecrotic toxins”) mostraram que danos renais, hemólise, dermonecrose e edema são eventos dependentes da atividade catalítica dessas enzimas (Kusma *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009; Paludo *et al.*, 2009). Acredita-se que a hidrólise de lipídios, gerando mediadores como ceramida-1-fosfato e ácido lisofosfatídico, possa ativar determinadas vias de sinalização causando alterações fisiopatológicas e os efeitos deletérios dessas toxinas (Kusma *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009; Chaim *et al.*, 2011a).

### 2.3.3 Serinoproteases

Serinoproteases são proteases que clivam ligações peptídicas e são caracterizadas por possuírem um resíduo de aminoácido serina no sítio catalítico, essencial para o ataque nucleofílico do substrato (atividade catalítica).

Em venenos loxoscélicos, atividades de proteases foram inicialmente identificadas em 1976, pela ação do veneno de *L. reclusa* sobre larvas de *Heliothis virescens* e *Musca domestica* (Eskafi e Norment, 1976). O veneno dessa espécie possui também atividade hidrolítica sobre substratos do tipo L- aminoacil- $\beta$ -naftilamida, mostrando atividade eficiente sobre L-Leucil- $\beta$ -naftilamida (Jong *et al.*, 1979).

No veneno de *L. intermedia* foi descrita atividade serinoproteásica em ensaios que revelaram atividade gelatinolítica em 85 e 95 kDa após ativação com tripsina. A identificação de serinoprotease foi realizada devido à inibição da atividade proteolítica somente por inibidores como PMSF, leupetina, benzamidina, aprotinina e inibidor de tripsina de soja, mostrando que a serina é um resíduo funcional do sítio ativo dessas proteases (Veiga *et al.*, 2000a). Concluiu-se que no veneno de *L. intermedia* existem pelo menos duas serinoproteases com seletividade de substratos, uma vez que, foi constatada atividade frente à gelatina (colágeno desnaturado), baixa atividade frente à caseína e não apresentaram atividade proteolítica em laminina, BSA, fibrinogênio, hemoglobina e imunoglobulina G (Veiga *et al.*, 2000a). É sugerido que essas serinoproteases possam atuar de maneira complementar a atividade proteolítica de outras proteases do veneno

(metaloproteases) ou ainda de proteases liberadas pelo tecido danificado pelo veneno (Veiga *et al.*, 2000a).

#### 2.3.4 Hialuronidasas

Estudos com veneno de *L. reclusa* descreveram pela primeira vez a presença de atividade hialuronidásica em venenos loxoscélicos, descritas como toxinas de 33 e 63 kDa (Wright *et al.*, 1973). Após esse estudo, atividades semelhantes foram descritas em venenos de *L. rufescens* (Young e Pincus, 2001), de *L. reclusa*, de *L. deserta*, de *L. gaucho*, de *L. laeta* e de *L. intermedia* (Barbaro *et al.*, 2005). Um estudo mais recente com o veneno total de *L. intermedia*, demonstrou atividade lítica de ácido hialurônico e condroitin-sulfato na altura de 41 e 43 KDa (Da Silveira *et al.*, 2007a). Através de reações colorimétricas, foi caracterizado que a hialuronidase desse veneno é uma endo- $\beta$ -N-acetil-D-hexosaminidase. Análises por microscopia confocal de imunofluorescência da derme de coelho expostos ao veneno total, confirmaram a redução da detecção de ácido hialurônico intacto nas biópsias do tecido lesionado (Da Silveira *et al.*, 2007a).

#### 2.3.5 TCTP

As proteínas da família da TCTP são altamente conservadas em eucariotos, possuem baixa massa molecular (~ 20 kDa), são amplamente expressas em diversos organismos e participam de muitos eventos intracelulares (Gachet *et al.*, 1999). Em camundongos e *Drosophila* a proteína TCTP é descrita como essencial para o desenvolvimento embrionário e proliferação celular (Bommer e Thiele, 2004; Hinojosa-Moya *et al.*, 2008). Além das funções intracelulares desempenhadas pelas TCTPs, extracelularmente elas são capazes de degranular mastócitos induzindo a liberação de histamina, normalmente em pacientes parasitados ou com alergia (Bheekha-Escura *et al.*, 2000).

A TCTP identificada em glândulas de veneno de *L. intermedia*, foi produzida na forma de proteína recombinante e quando inoculada em camundongos induziu edema de pata e aumentou a permeabilidade vascular quando injetada intradermicamente. Essas atividades biológicas sugerem a participação da TCTP como fator liberador de histamina nos quadros de envenenamento após acidentes com aranhas do Gênero *Loxosceles* (Sade *et al.*, 2012).

### 2.3.6 Alérgenos

Alérgeno é uma denominação utilizada para substâncias capazes de induzir resposta imune com produção de imunoglobulina E (IgE) (Arlian, 2002). Em sua maioria, alérgenos são proteínas ou glicoproteínas capazes de induzir reações de hipersensibilidade quando inalados, ingeridos, injetados ou absorvidos através da pele e mucosas (Arlian, 2002; Galli *et al.*, 2008).

Muitos alérgenos foram identificados em venenos de artrópodes como abelhas, vespas e formigas (Bonifazi *et al.*, 2005). Análise proteômica do veneno de *L. intermedia* demonstrou a possível ocorrência de proteína alergênica similar a um alérgeno de ácaro (Dos Santos *et al.*, 2000). Os dados obtidos no transcriptoma de glândulas de veneno dessa mesma espécie corroboram com esse dado proteômico. Foram identificados transcritos que codificam para alérgenos com as maiores similaridades com alérgenos da aranha *Lycosa sigoriensis* e de escorpião *Opisthacanthus cayaporum* (Gremski *et al.*, 2010). Adicionalmente, no transcriptoma de *L. laeta* também foi encontrado alérgeno de veneno (Fernandes-Pedrosa Mde *et al.*, 2008). Estudos adicionais são necessários para comprovar a existência dos alérgenos em venenos loxoscélicos, como também, para compreender sua participação no desenvolvimento do loxoscelismo. Nesse sentido, há relato de obtenção da sequência nucleotídica completa de um alérgeno do veneno de *L. intermedia* que codifica uma proteína com massa molecular predita de 46 kDa. A clonagem molecular dessa sequência foi realizada para expressão em modelos heterólogos com intuito futuro de avaliar sua funcionalidade biológica (FERRER, 2010).

### 2.3.7 Metaloproteases

Metaloproteases são enzimas proteolíticas dependentes de metal para atividade catalítica e, em sinergismo com hialuronidasas e serinoproteases, as metaloproteases dos venenos loxoscélicos atuam na degradação de componentes da matriz extracelular (Feitosa *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000b; Da Silveira *et al.*, 2002; Chaim *et al.*, 2011b).

#### 2.3.7.1 Caracterização de metaloproteases em veneno de *Loxosceles* spp

As metaloproteases foram inicialmente descritas em venenos de *L. intermedia* por FEITOSA e colaboradores (1998) que caracterizaram duas metaloproteases: a Loxolisina A de massa molecular de 20-28 kDa com atividade fibronectinolítica e atividade fibrinogenolítica parcial, degradando preferencialmente as cadeias A $\alpha$  e B $\beta$ ; e a Loxolisina B de 32-35 kDa com atividade gelatinolítica. Essas atividades foram identificadas devido à inibição da degradação dos substratos observadas na presença dos quelantes de metais divalentes 1-10 fenantrolina e EDTA.

Algumas críticas surgiram nesta época, pois se cogitava a possibilidade de que essas metaloproteases identificadas fossem proteases oriundas do conteúdo gástrico das aranhas, contaminantes do veneno devido ao modo de obtenção do mesmo (Feitosa *et al.*, 1998). Porém, foi comprovado que as metaloproteases são realmente constituintes do veneno de *L. intermedia* através de estudo comparativo do perfil protéico e da atividade metaloproteásica realizado entre veneno obtido por eletrochoque (mesma técnica de obtenção utilizada por FEITOSA e colaboradores (1998) e extrato de glândulas de veneno de espécimes de *L. intermedia* (Figura 5) (Da Silveira *et al.*, 2002). Com esse estudo, mostrou-se que a atividade metaloproteásica está presente no extrato de glândulas de veneno que é totalmente livre de contaminantes gástricos. Outros trabalhos também descreveram a presença de metaloproteases nos venenos de *L. reclusa*, *L. deserta*, *L. rufescens* e *L. laeta*. (Young e Pincus, 2001; Barbaro *et al.*, 2005; Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008).

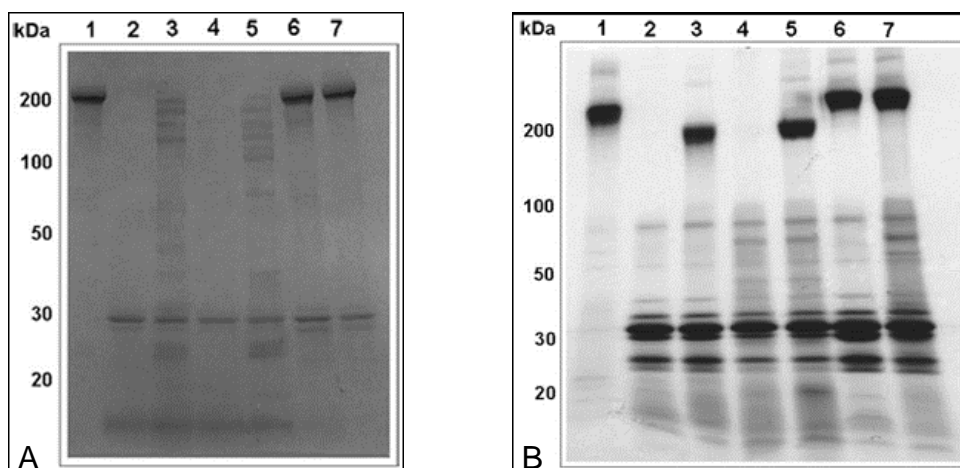


FIGURA 5: ATIVIDADE METALOPROTEÁSICA DO VENENO DE *L. intermedia*: COMPARAÇÃO DE EXTRATO DE GLÂNDULAS E VENENO OBTIDO POR ELETROCHOQUE. A – Avaliação da atividade proteolítica frente a fibronectina (FN). B – Avaliação da atividade proteolítica frente a fibrinogênio (FG). 1- Molécula controle (FN ou FG), 2 – Perfil eletroforético das proteínas do veneno obtido por eletrochoque. 3 – Fibronectina (A) ou Fibrinogênio (B) incubado com veneno obtido por eletrochoque, 4 - Perfil eletroforético das proteínas do extrato de glândulas, 5 – Fibronectina (A) ou Fibrinogênio (B) incubado com extrato de glândulas. 6 e 7 – São tratamentos iguais às colunas 3 e 5, mas na presença de inibidor 1-10-fenantrolina. Esses ensaios comprovam a presença de atividade metaloproteásica do veneno total de *L. intermedia* ADAPTADO DE: Da Silveira *et al.*, 2002.



Em estudo mais recente, por meio de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno de *L. intermedia*, foi clonada e caracterizada uma metaloprotease pertencente à família das astacinas, denominada LALP (“*Loxosceles* Astacin-like Protease”) (Figura 6). A descoberta da LALP foi muito significativa, pois foi a primeira descrição de um membro da família das astacinas presente em um veneno animal (Da Silveira *et al.*, 2007c).

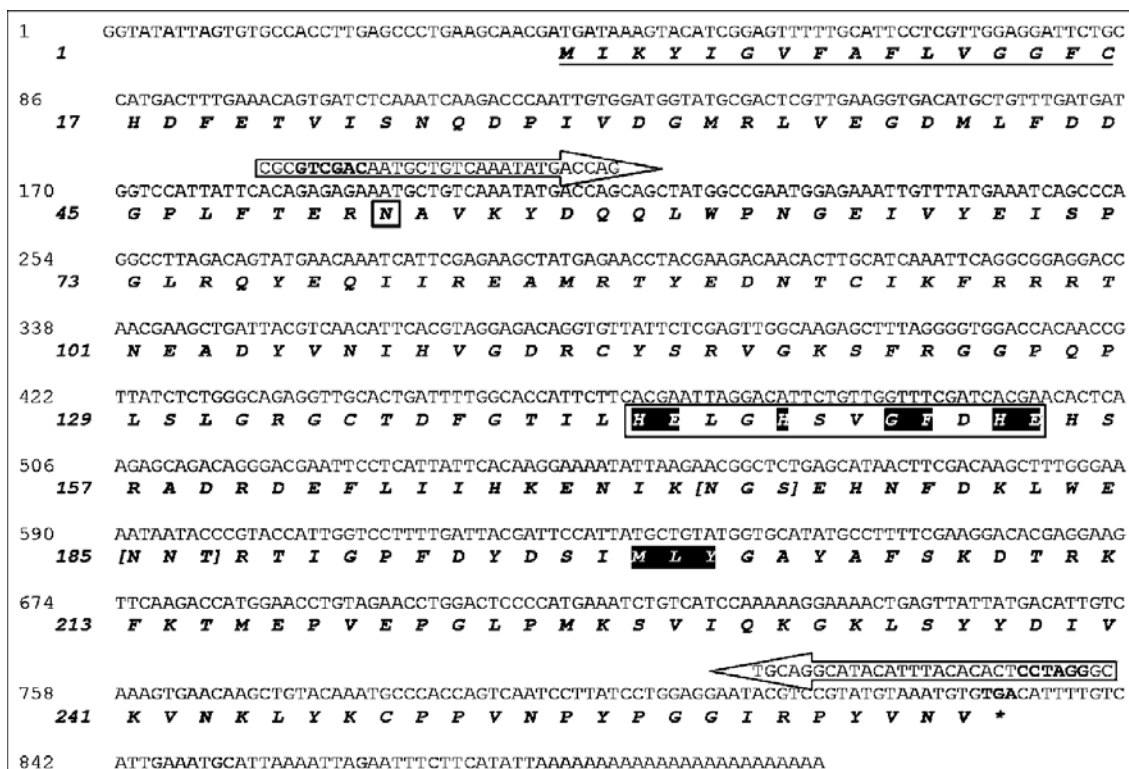


FIGURA 6: SEQUENCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DEDUZIDA DA LALP1. Nas flechas estão os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a subclonagem molecular em pET-14b. O resíduo de asparagina que indica o início da proteína madura está destacado por um quadrado. No retângulo está o domínio catalítico da família das astacinas e com os resíduos conservados destacados em preto. Mais adiante, em preto estão destacados os resíduos da volta de metionina. ADAPTADO DE: Da Silveira *et al.*, 2007c.

Apesar das inúmeras identificações de metaloproteases em venenos loxoscélicos, ainda não foram elucidados seus papéis nos eventos tóxicos induzidos pelo veneno. Acredita-se que a atividade destas metaloproteases estaria relacionada com os distúrbios hemostáticos descritos após o envenenamento, como danos nos vasos sanguíneos e hemorragias na derme, além de possivelmente atuar como um fator de espalhamento das demais toxinas do veneno devido a sua ação sobre os componentes da matriz extracelular (Feitosa *et al.*, 1998; Da Silveira *et al.*, 2002; Zanetti *et al.*, 2002). As metaloproteases poderiam agir também sobre outros

componentes do veneno, ou mesmo de moléculas biológicas do organismo do indivíduo acidentado, gerando moléculas/peptídeos ativos (Da Silveira *et al.*, 2007c).

### 2.3.7.2 Família das astacinas

As metaloproteases dependentes de zinco para sua atividade catalítica pertencem à superfamília das Metzincinas que compreende as famílias das Adamalinas ou Reprolisinas, Serralisinas, Astacinas, Metaloproteinases de Matriz ou Colagenases (Stocker *et al.*, 1995). Segundo STÖCKER e colaboradores (1995), os membros das famílias das metzincinas possuem domínio característico conservado HEXXHXXGXXHZ, no qual os três resíduos de histidinas estão envolvidos na ligação do íon de zinco, necessário para atividade catalítica, e uma volta de metionina (MXY) (FIGURA 7).

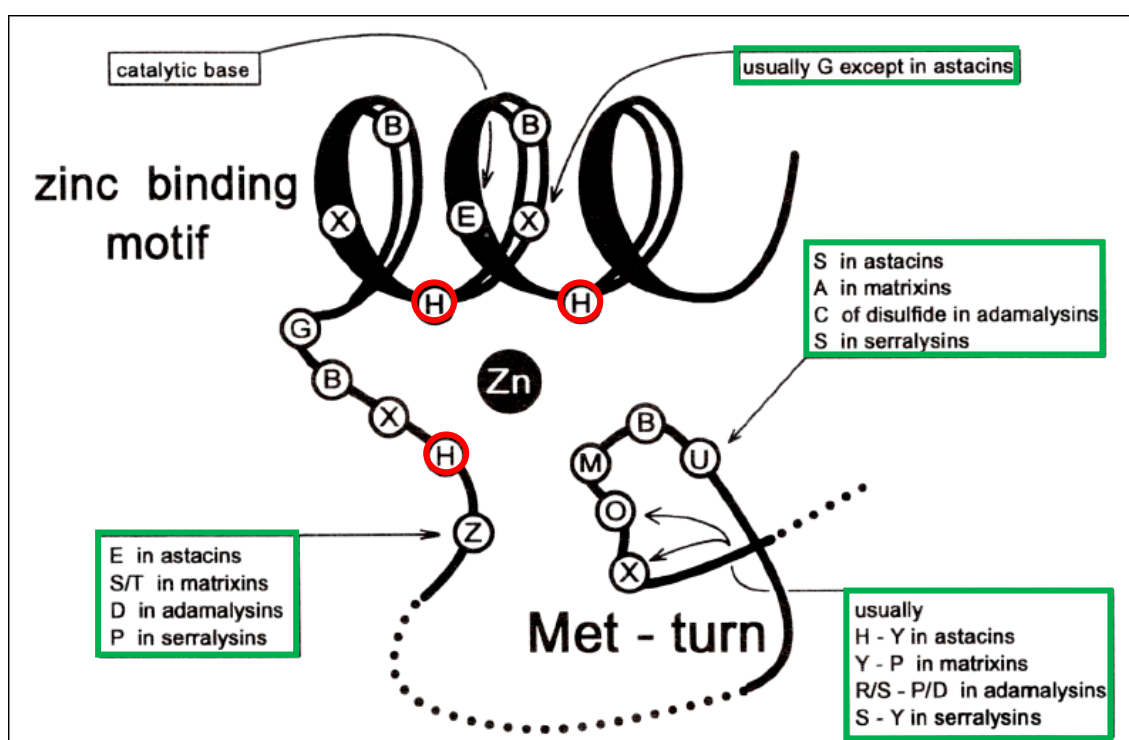


FIGURA 7: DESENHO ESQUEMÁTICO DO SÍTIO CATALÍTICO E DA VOLTA DE METIONINA DAS METZINCINAS. Nos retângulos verdes estão indicados os resíduos de aminoácidos que diferem em cada uma das famílias de metzincinas. Os três resíduos de histidinas do sítio catalítico que fazem a ligação do íon de zinco estão destacados em vermelho. ADAPTADO DE: Stocker *et al.*, 1995.

As proteínas do tipo astacina (família M12A) são caracterizadas por possuírem uma sequência aminoacídica consenso para ligação de zinco composta por 18 resíduos de aminoácidos – HEXXHXXGXXHEXXRXDR – que inicia com a sequência mínima de ligação ao zinco (HEXXH) presente na maioria das

metaloendopeptidases. Outra região bastante conservada (SXMHY) inclui um resíduo de tirosina envolvido na ligação ao zinco e um resíduo de metionina envolvido em uma volta de metionina presente na cadeia polipeptídica (Bond e Beynon, 1995). Os membros da família das astacinas podem possuir na sua porção C-terminal outros domínios não catalíticos bastante conservados, tais como: domínio do tipo EGF, domínio do tipo CUB e/ou domínio MAM (Gomis-Ruth, 2003). A família das Astacinas recebeu este nome devido à primeira descrição dessas zinco-peptidases ter sido de uma enzima digestiva de *Astacus astacus* (Dumermuth *et al.*, 1991; Stocker *et al.*, 1995). Fazem parte dessa família proteases digestivas, proteases extracelulares e proteases ligadas à membrana que estão envolvidas no processamento de peptídeos e que atuam na ativação de fatores de crescimento, degradação de polipeptídeos e processamento de moléculas extracelulares (Dumermuth *et al.*, 1991; Bond e Beynon, 1995; Gomis-Ruth, 2003; Mohrlen *et al.*, 2004). As enzimas do tipo astacinas são amplamente conservadas evolutivamente e têm sido encontradas em diferentes espécies, como humanos, camundongos, ratos, anfíbios, peixes, insetos, moluscos e até em bactérias, o que demonstra sua importância biológica (Bond e Beynon, 1995; Mohrlen *et al.*, 2004). Os membros originais da família são: a astacina do *Astacus astacus*, BMP-1 (proteína morfogenética de osso-1) de osso humano, meprinas de rim de camundongo e de intestino humano, e UVS.2, uma proteína do desenvolvimento de embriões de *Xenopus laevis* (Bond e Beynon, 1995). Essas enzimas são sintetizadas como pró-enzimas inativas e a remoção das pró-sequências constitui o principal mecanismo de ativação (Bond e Beynon, 1995); porém, existe descrição de uma astacina recombinante de *Limulus polyphemus* que possui atividade mesmo na sua forma de pró-enzima (Becker-Pauly *et al.*, 2009). Nesse artrópode ancestral (*L. polyphemus*) foram descritas duas astacinas, uma denominada LAST (“*Limulus* astacin”) que possui o domínio catalítico e a volta de metionina e outra denominada LAST-MAM devido à presença de um domínio MAM na sua porção carboxi-terminal. Tais astacinas foram encontradas em diferentes tecidos e, pela distribuição observada no tecido cerebral e no olho, acredita-se que possam desempenhar funções no sistema nervoso central (Becker-Pauly *et al.*, 2009). Em nematódeos *C. elegans* existem 40 genes que codificam astacinas, as quais constituem a família NAS (“Nematode Astacins”). As astacinas de *C. elegans* são divididas em 6 grupos distintos porque

elas diferem nas suas estruturas das extremidades C-terminal, tanto na diversidade de domínios não catalíticos quanto na quantidade de repetições desses domínios na sequência protéica (Mohrlen *et al.*, 2003). A NAS-37 tem função importante no desenvolvimento da larva de *C. elegans* e medeia as ecdises, uma vez que, a presença de mutações no gene da NAS-37 resultam em defeitos durante os processos de muda (Davis *et al.*, 2004). A astacina descrita como constituinte do veneno de *L. intermedia* (LALP1) possui os domínios conservados da família das astacinas (HEXXHXXGXXHEXXRXDR e SXMHY) e não apresenta domínios não catalíticos na porção C-terminal (Da Silveira *et al.*, 2007c), como ocorre também no protótipo da família (astacina de *A. astacus*) e na LAST (“*Limulus* astacin”) (Gomis-Ruth, 2003; Becker-Pauly *et al.*, 2009).

#### 2.3.7.3 Astacinas loxoscélicas

Os estudos de astacinas em venenos de aranhas-marrons são recentes e pouco se sabe a respeito de suas funcionalidades biológicas.

Após a descrição da LALP1, foram identificadas duas novas sequências que codificam metaloproteases do tipo astacina nas glândulas de veneno de *L. intermedia*, denominadas LALP2 e LALP3, mostrando que as astacinas compõem uma família de toxinas intra-espécie (Trevisan-Silva *et al.*, 2010). Em venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* também foram identificadas astacinas (LALP4 e LALP5), sugerindo a existência de uma família de toxinas inter-espécie e levantando a possibilidade dessas toxinas estarem presentes em venenos de todo o gênero *Loxosceles* (Trevisan-Silva *et al.*, 2010). As cinco LALPs descritas possuem identidade aminoacídica com outros membros da família das astacinas (TABELA 2) (Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

	LALP2	LALP3	LALP4	LALP5
LALP2	—	55	44	39
LALP3	55	—	48	40
LALP4	44	48	—	72
LALP5	39	40	72	—
LALP1	43	46	75	75
Astacin	31	30	34	31
LAST	38	38	49	41
LAST-MAM	34	38	41	37
NAS-4	35	35	44	40
NAS-6	35	35	41	40
NAS-7	32	34	42	38
NAS-15	33	39	42	40
CBR-NAS-7	32	34	41	38
hOvast	25	26	36	30
mOvast	27	29	38	33
sTolloid	28	32	40	31
hTolloid1	31	29	38	31
hTolloid2	30	30	40	31
mTolloid	31	29	38	31
hMeprinA	24	27	33	24
mMeprinA	24	28	33	25
hMeprinB	29	26	35	32
mMeprinB	29	31	33	34
Alveolin	35	36	35	32
BP10	33	31	42	37
SpAN	34	30	42	35
XHE	26	31	38	27

TABELA 2: PORCENTAGEM DE IDENTIDADE AMINOACÍDICA ENTRE MEMBROS DA FAMÍLIA DAS ASTACINAS. ADAPTADO DE: Trevisan-Silva *et al.*, 2010.

As análises das sequências aminoacídicas de LALP4 e LALP5 não trazem muitas informações porque não foram obtidas as sequências completas. Porém, as sequências parciais obtidas possuem a região do domínio catalítico das astacinas e da volta de metionina. Além disso, o alinhamento das sequências das LALPs mostra a conservação de resíduos entre os membros da família das astacinas loxoscélicas (Figura 8A). A LALP1, LALP2 e LALP3 apresentam a estrutura mais simples dentre os membros das astacinas, com peptídeo sinal, propetídeo, domínio catalítico e a volta de metionina (Figura 8B). Esse último motivo é descrito como elemento estrutural importante para todas as metaloproteases dependentes de zinco e contribui para a correta formação do domínio de ligação ao zinco. Como mostrado na Figura 8, todas as LALPs possuem a volta de metionina (SXMHY), porém;

existem substituições de resíduos de aminoácidos quando comparadas com diferentes membros da família das astacinas e entre as astacinas loxoscélicas. LALP1, LALP4 e LALP5 possuem substituição de histidina 148 encontrada na maioria das astacinas para leucina e a LALP2 e LALP3 possuem substituição da histidina 148 para isoleucina (Figura 8A). Essas substituições de resíduos de aminoácidos pode modificar a estrutura tridimensional e podem ser responsáveis por diferentes atividades das LALPs (TREVISAN-SILVA et al., *in press*). Porém, são necessários estudos comparativos tanto das estruturas quanto das funções das LALPs para validação dessa hipótese.

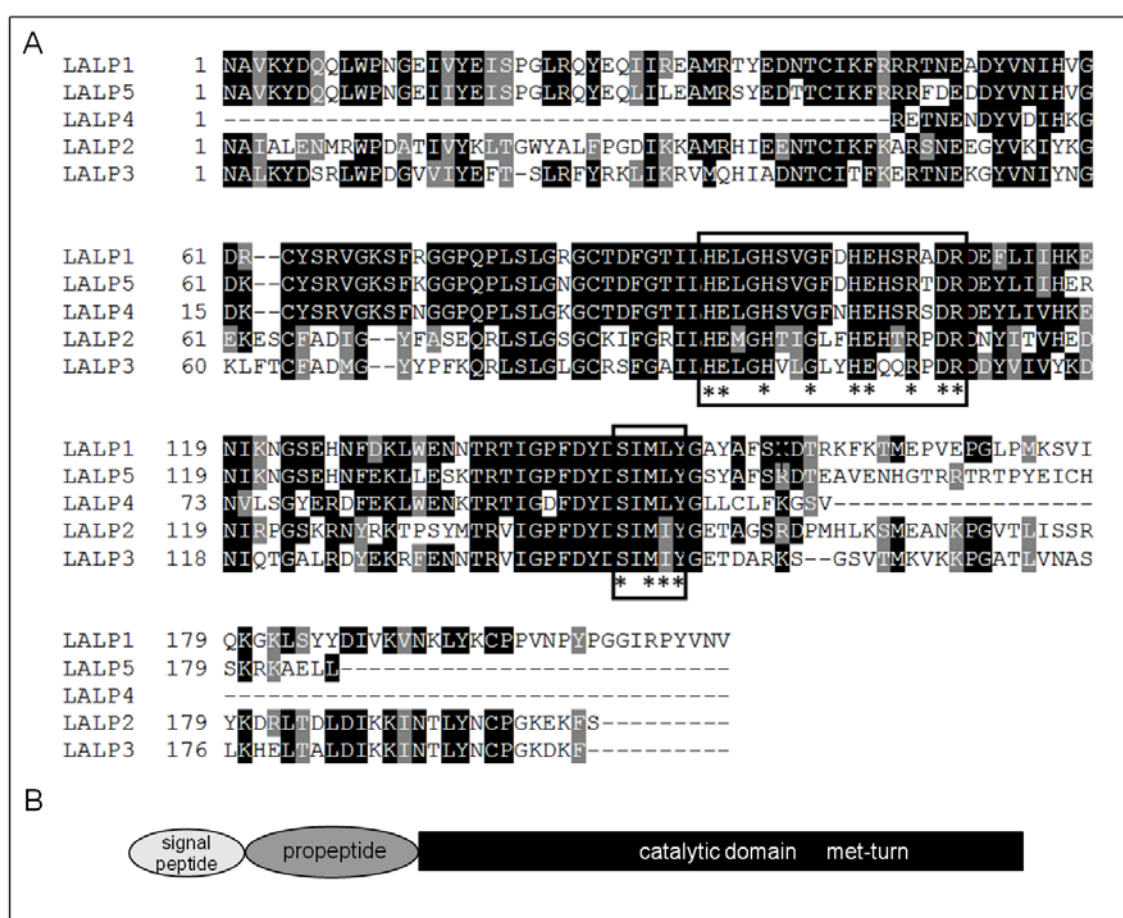


FIGURA 8: CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DAS LALPS MADURAS. A – Alinhamento das sequências aminoacídicas maduras das astacinas loxoscélicas. O alinhamento foi feito utilizando o programa CLUSTALW2 ([www.ebi.ac.uk/CLUSTAL](http://www.ebi.ac.uk/CLUSTAL)). Os resíduos de aminoácidos conservados estão em preto e as substituições conservativas estão em cinza. Nos retângulos estão as assinaturas das astacinas, sendo que o sítio catalítico (HEXXHXXGXXHEXXRXDR) e a volta de metionina (SXMHY) estão destacados com asteriscos. B – Desenho esquemático da sequência das LALPs com peptídeo sinal, pro-peptídeo e proteína madura contendo domínio catalítico e volta de metionina. ADAPTADO DE: TREVISAN-SILVA et al., *in press*.

Estudos de atividade bioquímica e biológica das astacinas estão restritos a um estudo com a LALP1 recombinante (Da Silveira et al., 2007c). Essa toxina de *L. intermedia* foi expressa em *E. coli* de maneira insolúvel e após refolding in vitro por

diálise, foram descritas atividades proteolítica sobre a fibronectina (cadeia A e B), gelatina e cadeias A $\alpha$  e B $\beta$  de fibrinogênio. Além disso, quando células subendoteliais de aorta de coelhos em cultura foram expostas a LALP1, foram observadas alterações morfológicas, perda de adesão célula-célula e célula-substrato (Figura 9) (Da Silveira *et al.*, 2007c). A função biológica da LALP1 ainda não está completamente elucidada, uma vez que os estudos com tal toxina ficaram restritos aos ensaios “in vitro” devido à dificuldade de obtenção dessa toxina recombinante solúvel e ativa em quantidade suficiente para ensaios “in vivo” (Da Silveira *et al.*, 2007c).

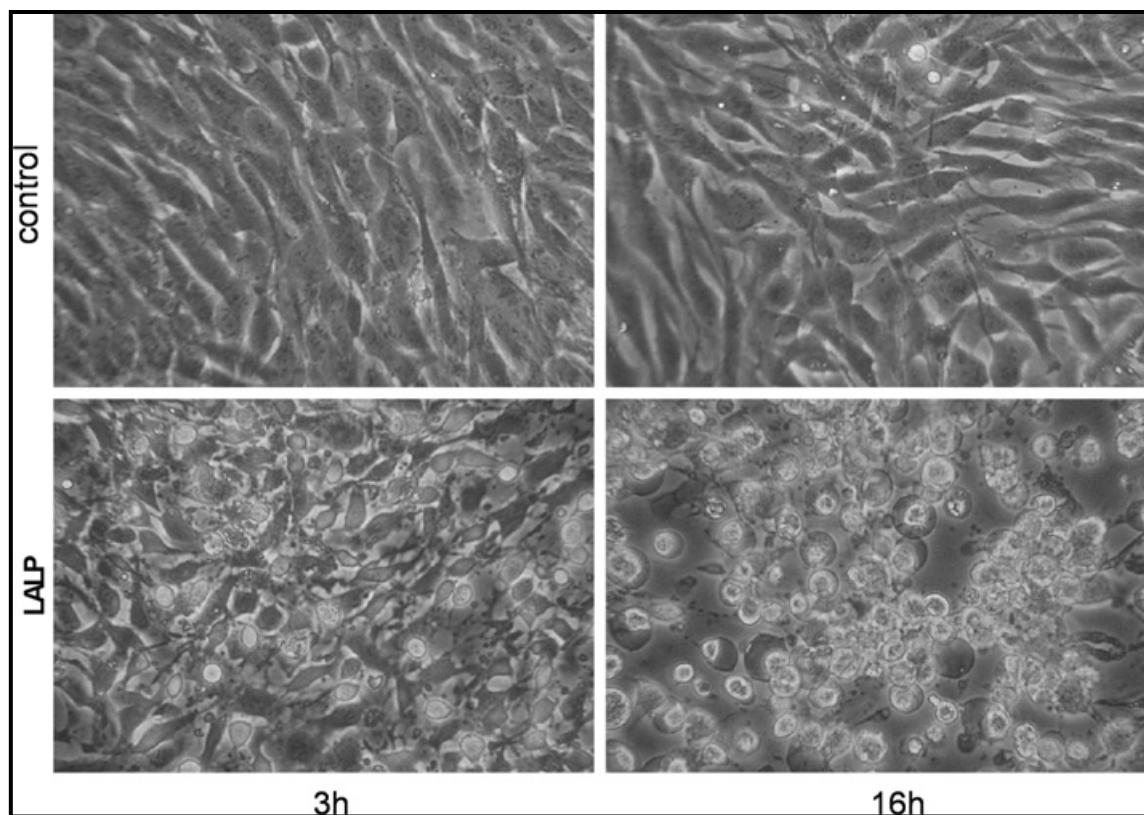


FIGURA 9: EFEITO DA LALP SOBRE CÉLULAS SUBENDOTELIAIS DE AORTA DE COELHO. As imagens superiores são os controles nos quais as células foram mantidas em cultura nas mesmas condições das células incubadas com a LALP. As imagens inferiores mostram as alterações das células após 3 e 6 h de incubação com LALP (5 $\mu$ g/mL). É possível observar que ocorre alteração da morfologia das células com perda do contato célula-célula e célula-matriz de forma tempo dependente. ADAPTADO DE: Da Silveira *et al.*, 2007c.

## 2.4 APLICAÇÕES DE TOXINAS LOXOSCÉLICAS

Na natureza, as toxinas presentes em venenos de animais são utilizadas para defesa e para alimentação (imobilizar e matar presas) (Rash e Hodgson, 2002). O interesse no uso dessas moléculas bioativas como fonte para produção de medicamentos, desenvolvimento de novos fármacos e utilização para estudos de

diferentes eventos biológicos tem aumentado ao longo dos anos (Chaim *et al.*, 2011b; King, 2011; Vetter, 2011).

Estudos com venenos de serpentes que caracterizaram diversas toxinas bioativas com efeitos frente a lipídeos e proteínas, atuando nos sistemas hemostáticos e musculares levaram à descoberta e desenvolvimento de diferentes drogas para tratamento de doenças (Marsh e Williams, 2005; Senff-Ribeiro *et al.*, 2008). Dentre essas drogas, uma bastante conhecida é o Captopril, desenvolvido a partir de estudos com veneno de *Bothrops jararaca*, o qual é utilizado atualmente para controle da pressão arterial como inibidor da enzima conversora de angiotensina - ECA (Chaim *et al.*, 2011b).

Nesse contexto, os venenos loxoscélicos, por serem constituídos de muitos peptídeos inseticidas e proteínas bioativas, possuem um grande potencial de aplicações biotecnológicas. A primeira aplicação biotecnológica de veneno de aranhas-marrons foi a ARACHnase que foi desenvolvida para utilização como controle positivo para teste-diagnóstico de Lupus (Mcglasson *et al.*, 1993). Os soros produzidos com veneno de *Loxosceles* (descritos no item 2.2.3) são utilizados como bioprodutos na soroterapia em pacientes com quadro de envenenamento. Adicionalmente, a produção de várias toxinas recombinantes de *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. boneti*, *L. gaucho* e *L. reclusa*, das diversas classes discutidas anteriormente, fornece uma grande variedade de moléculas para fins biotecnológicos (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008; Chaim *et al.*, 2011b).

Uma das possibilidades de aplicação para a classe de toxinas mais estudada dos venenos loxoscélicos, as fosfolipases-D, é a sua utilização delas como reagentes para imunodiagnóstico do loxoscelismo por meio da identificação e quantificação dessa classe de molécula em amostras de pacientes com suspeita de picada por aranha-marrom. Ainda, levando-se em consideração que os substratos das fosfolipases-D são fosfolipídeos de membranas celulares, essas toxinas podem ser utilizadas em diferentes protocolos para estudos de membranas celulares relacionados com efeitos biológicos de metabólicos lipídicos e vias de sinalização (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008; Chaim *et al.*, 2011b).

As metaloproteases, foco do presente estudo, também possuem uma variedade imensa de possíveis aplicações. Devido às atividades proteolíticas frente a diferentes proteínas, as astacinas loxoscélicas podem ser utilizadas em



protocolos de estudos envolvendo: montagem e remodelagem da matriz extracelular, tumorigênese e metástase, ativação enzimática (zimogênios), sinalização celular baseadas em degradação de proteínas e respostas inflamatórias. Podem também ser utilizadas como co-adjuvantes para administração de diferentes drogas, como base para desenho de novas moléculas agonistas e/ou inibidoras e podem ser utilizadas terapeuticamente como agentes trombolíticos. Além destas possíveis aplicações biotecnológicas, as metaloproteases podem auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos e diagnósticos eficientes para o loxoscelismo (Senff-Ribeiro *et al.*, 2008; Chaim *et al.*, 2011b).

### 3.1 INTRODUÇÃO

As glândulas produtoras de veneno situadas no céfalotórax das aranhas-marrons, são formadas por uma camada de células epiteliais responsáveis pela síntese e secreção das proteínas do veneno, e são revestidas externamente por 2 camadas de tecido muscular estriado. As células epiteliais dessas glândulas apresentam grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, o que mantém a intensa produção de proteínas (Dos Santos *et al.*, 2000). A quantidade de veneno produzido por uma aranha-marrom é variável e dependente do tamanho, sexo e idade do animal, mas geralmente são poucos microlitros (máximo de 4  $\mu$ L) contendo de 30 a 100  $\mu$ g de proteínas totais (Tambourgi *et al.*, 2000; Sams *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2004). Portanto, uma das principais dificuldades no estudo dos venenos loxoscélicos é a obtenção de grandes quantidades do veneno total e, conseqüentemente, das toxinas nativas purificadas.

Com os avanços em biologia molecular foi possível estudar proteínas de venenos isoladamente. A clonagem e expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos possibilitaram a avaliação individualizada de toxinas que têm atividades muitas vezes sinérgicas e estão na mistura proteica que compõe os venenos animais (Geren *et al.*, 1976; Diniz *et al.*, 2006). Existem muitos estudos com toxinas recombinantes dos venenos loxoscélicos, mas a grande maioria refere-se à caracterização bioquímica e biológica de fosfolipases-D (Chaim *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2007b; Ribeiro *et al.*, 2007; Appel *et al.*, 2008; De Oliveira-Christoff *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009). Somente um estudo descreve obtenção e caracterização parcial de uma astacina recombinante (LALP1). A LALP1 foi produzida em *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS de forma insolúvel, formando agregados de proteínas denominados corpos de inclusão (Da Silveira *et al.*, 2007c; Garcia-Fruitos *et al.*, 2012). Para realizar os ensaios de atividade foi realizado redobramento em diálise após a purificação por afinidade, resultando em rendimento final bastante baixo (Da Silveira, 2006; Da Silveira *et al.*, 2007c). Portanto, pouco se sabe sobre a atividade e funcionalidade dessa família de toxinas loxoscélicas (Da Silveira *et al.*, 2007c; Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

É descrito que a grande maioria das proteínas recombinantes expressas em grandes quantidades em bactérias *E. coli* ou outros sistemas heterólogos são insolúveis e formam no interior das células agregados proteicos denominados

corpos de inclusão, que são agregados densos com 0,2 a 0,5 mm de diâmetro. A distribuição da proteína recombinante entre a fração solúvel (citoplasma) e a fração insolúvel (corpos de inclusão) depende da natureza da proteína e das condições em que ela é expressa (temperatura e indução) (Peternel *et al.*, 2008). O mecanismo exato da formação de corpos de inclusão ainda não foi totalmente descrito, mas sabe-se que ocorre quando as proteínas adquirem um estado parcialmente dobrado, mal dobrado ou sem dobramento, e então se agregam e precipitam. É sabido que durante a superprodução da proteína recombinante ocorre a exposição de regiões hidrofóbicas capazes de realizar interações intra e intermoleculares formando os agregados. Isso pode ocorrer devido à rapidez com que a proteína de interesse é sintetizada, não permitindo o dobramento correto. Uma vez que as moléculas protéicas se encontram em corpos de inclusão, elas estão protegidas de proteólise, mas não apresentam estrutura tridimensional, que é crucial para o desempenho de sua atividade biológica (Burgess, 2009). Existem muitas estratégias para tentar solucionar esses problemas de insolubilidade com proteínas recombinantes, tais como: otimização da quantidade de indutor e da temperatura no momento da indução da expressão, diferentes métodos de dobramento *in vitro* durante e após a purificação, diferentes cepas de *E. coli* modificadas para facilitar o dobramento das proteínas recombinantes (cepas com citoplasma menos redutor para facilitar formação de pontes dissulfeto e cepas com tRNA para *códons* raros de *E. coli*) e muitos vetores para expressão de proteínas de fusão objetivando melhorar a solubilidade da proteína de interesse. Além dos sistemas de expressão procarióticos, existem os sistemas eucarióticos. A escolha de um ou outro sistema geralmente está relacionada ao investimento necessário, tempo despendido até a obtenção da proteína de interesse e rendimento ao final do processo. Como em geral os sistemas eucarióticos (leveduras, células de inseto e células de mamíferos) são mais caros e apresentam menor rendimento, a grande maioria dos estudos optam por utilizar sistemas procarióticos, quase exclusivamente células de *E. coli* (Sorensen e Mortensen, 2005).

Portanto, considerando a existência de tantas possibilidades de expressão de toxinas recombinantes e as dificuldades de obtenção das astacinas de *L. intermedia* recombinantes solúveis em sistema procariótico com a cepa BL21(DE3)pLysS, realizamos diferentes estratégias para a obtenção da LALP1 e LALP2 solúveis,

biologicamente ativas e em quantidades suficientes para realização de ensaios de atividade “in vitro” e “in vivo”. Isso porque, o intuito é estudar a atividade biológica na tentativa de elucidar a participação das astacinas frente aos efeitos tóxicos do veneno de *L. intermedia* e investigar possíveis aplicações biotecnológicas.

## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de astacinas recombinantes do veneno de *L. intermedia* e caracterização da atividade bioquímica e biológica

#### Objetivos Específicos

- Clonar e expressar em sistema procariótico as astacinas LALP1 e LALP2;
- Otimizar a obtenção das toxinas solúveis, purificadas e biologicamente ativas;
- Avaliar atividade proteolítica da LALP1 e da LALP2;
- Avaliar a atividade biológica das astacinas recombinantes (LALP1 e LALP2) relacionando-as com os efeitos tóxicos do veneno loxoscélico.

### 3.3 MATERIAIS e MÉTODOS

#### 3.3.1 REAGENTES

Os sais, ácidos, bases, solventes orgânicos e a fenantrolina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os marcadores de massa molecular para SDS-PAGE, o BSA, o ágar-ágar, o Ponceau-S, o OPD e os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunodeteção (*Western Blotting*) e ELISA foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MI, EUA). As enzimas de restrição e modificação, o marcador de números de pares de bases “Gene Ruler 100 pb DNA Ladder Plus” e o IPTG foram adquiridos da empresa Fermentas (Vilnius, Lituânia). O BCIP, o NBT e o brometo de etídio foram adquiridos da Promega (Madison, WI, EUA). Os reagentes dodecil sulfato de sódio, corante Azul de Coomassie, Tris e Glicina foram adquiridos da GibcoBRL (Grand Island, NY, EUA). O TRIzol, a agarose, a resina Ni-NTA agarose e os reagentes para RT-PCR foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). DEPC e os antibióticos foram adquiridos da USB (Cleveland, OH, EUA). Os oligonucleotídeos empregados em PCR foram sintetizados pela Bioneer (Daejeon, Korea) e pela IDT (Coralville, IA, EUA). Os reagentes para meio de cultura, tais como peptona, extrato de levedura e triptona foram adquiridos da Himedia (Mumbai, Índia).

#### 3.3.2 OBTENÇÃO DE ASTACINAS RECOMBINANTES EM SISTEMA PROCARIÓTICO (*E. coli*)

##### 3.3.2.1 Subclonagem dos cDNA em vetor de expressão pET-SUMO

Para a subclonagem dos cDNAs das astacinas LALP1 e LALP2 em pET-SUMO, as reações de PCR de alta fidelidade foram feitas utilizando-se *Pfu* DNA polimerase e como molde os plasmídeos isolados do clone 43 (LALP1) e clone 32 (LALP2) da biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de *L. intermedia*. Como o plasmídeo pET-SUMO é um plasmídeo A-T, os oligonucleotídeos sense foram desenhados sem sítios de restrição. Como oligonucleotídeos anti-sense foram utilizados os mesmos desenhados anteriormente para pET-14b, porque os sítios de

restrição da *Bam*H I na extremidade 3' não interferem na clonagem e na obtenção das astacinas recombinantes (TABELA 3). Os produtos de PCR com *Pfu* DNA polimerase foram analisados em gel de agarose 2% preparado em tampão TAE contendo brometo de etídio 0,5 µg/ml e purificados com “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit” (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, EUA). Os produtos de PCR purificados foram submetidos à adenilação da porção 3' com *Taq* DNA polimerase. Para tanto, as reações foram preparadas com tampão para *Taq* DNA polimerase (1 X); dATP (0,2 mM); MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); produto de PCR de interesse (100 ng) e *Taq* DNA polimerase (1,25 U/50 µl). Essa mistura foi colocada em termociclador por 15 min a 72°C. Esses produtos adenilados foram utilizados para ligação em pET-SUMO. As reações de ligação foram realizadas com T4 DNA ligase na proporção 3:1 (inserto/vetor) a 16°C por 16 h em volume máximo de 10 µL. Os produtos das ligações (2 µL de cada ligação) foram utilizados para transformação de *E. coli* Mach1 quimicamente competentes. A transformação foi realizada em tubos de polipropileno, com incubação de 50 µL de bactérias Mach1 com 2 µL do produto de interesse adenilado. Essas misturas foram mantidas em gelo por 30 min e foram submetidas a choque térmico por 90 s a 42 °C e novamente em gelo por 2 min. Foram adicionados em cada tubo 250 µL de meio SOC e mantidos sob agitação branda por 1h a 37°C para recuperação. As bactérias recuperadas foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com kanamicina (50 µg/mL). O plaqueamento foi feito com auxílio de alça de Gauss estéril em duas placas, sendo que em uma delas foi plaqueado 100 µl da cultura de bactérias em meio SOC e a outra recebeu os 200 µl restantes que foram centrifugados (2.000 xg, 2 min, T.A.) e ressuspensos em 100 µl de meio SOC. As placas foram incubadas a 37°C por 16h em estufa BOD. Para identificar os clones contendo o inserto orientado corretamente, realizou-se PCR de colônia com oligonucleotídeos iniciadores do inserto (mesmo oligonucleotídeo iniciador “sense” utilizado para a clonagem) e do vetor (“T7 reverse”). Nos microtubos de PCR contendo as bactérias foram adicionados tampão para *Taq* DNA polimerase (1 X); dNTPs (0,2 mM); MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); oligonucleotídeo do inserto (0,2 mM); oligonucleotídeo “T7 reverse” (0,2 mM) e *Taq* DNA polimerase (1,25 U/50 µl). Essa mistura foi colocada em termociclador e submetida aos seguintes ciclos: 1 ciclo a 95°C/5min; 35 ciclos a 95°C/30s – 58°C/30s – 72 °C/1min; 1ciclo 72°C/10min e 1 ciclo de espera a 4°C/∞. O produto foi

analisado em gel de agarose 2% com brometo de etídeo. Os plasmídeos (LALP1/pET-SUMO e LALP2/pET-SUMO) de dois clones positivos de cada isoforma foram purificados por minipreparação com reagentes do *kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification Systems* (Promega) e as construções corretas foram confirmadas por sequenciamento de ambas as fitas, utilizando os iniciadores *T7 promoter* e *T7 reverse* com reagente *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies, Foster, CA, EUA) sequenciados em sequenciador automático *Genetic Analyser 3500* (Applied Biosystems™, Foster, CA, EUA). Esses plasmídeos recombinantes foram utilizados para as etapas de transformação de *E. coli* BL21(DE3)pLys-S e testes de expressão e solubilidade da LALP1 e LALP2.

Oligonucleotídeos iniciadores	pET-SUMO
LALP1 Sense	Foward LALP1 5'-AATGCTGTCAAATATGACCAGCAG-3'
LALP1 anti-sense	<i>Bam</i> HI 5'-CGGGATCCTCACACATTTACATACGGACGT-3'
LALP2 sense	Foward LALP2 5'-AACGCCATCGCTCTCGAGAAT-3'
LALP1 anti-sense	<i>Bam</i> HI LALP2 5'-CGGGATCCTTAATAAATTTTCTTGCC-3'

TABELA 3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA SUBCLONAGEM DAS ISOFORMAS DE ASTACINAS DO VENENO DE *L. intermedia* EM VETOR pET-SUMO.

### 3.3.2.2 Testes de expressão e solubilidade das astacinas recombinantes

As construções LALP1/pET-14b e LALP2/pET-14b foram produzidas em dois trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (DA Silveira *et al.*, 2007c; Trevisan-Silva *et al.*, 2010). Essas construções foram utilizados para transformar diferentes cepas de *E. coli*, BL21(DE3) pLysS (Invitrogen), Rosetta-gami (Novagen,



Madison, WI, EUA), AD494 (Invitrogen) e SHuffle T7 Express Lys Y (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). As construções LALP1/pET-SUMO e LALP2/pET-SUMO foram utilizadas para transformar células de *E. coli* BL21(DE3)pLys-S. As bactérias recuperadas foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL) para pET-14b ou kanamicina (50 µg/mL) para pET-SUMO, além dos antibióticos específicos para cada cepa foram utilizados cloranfenicol (34 µg/mL) para BL21(DE3)pLysS; kanamicina (50 µg/mL), tetraciclina (12,5 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) para Rosetta-gami; kanamicina (15 µg/mL) para AD494. O plaqueamento foi feito com auxílio de alça de Gauss estéril em duas placas, sendo que em uma delas foi plaqueado 100 µl da cultura de bactérias em SOC e a outra recebeu os 900 µl restantes que foram centrifugados (2.000xg, 2min, T.A.) e ressuspensos em 100 µl de meio SOC. As placas foram incubadas a 37°C por 16 h em estufa BOD.

Para os testes de expressão, primeiramente foi realizado um pré-inóculo no qual uma colônia de cada cepa transformada foi picada e colocada em 10 mL de meio LB-líquido com antibióticos e mantida sob agitação de 200 rpm a 37°C (BL21, AD494, Rosetta-gami) ou 30°C (SHuffle) por 16 h. O inóculo foi realizado diluindo-se o pré-inóculo 1:100 em 50 mL de meio LB fresco, contendo antibióticos, incubados em erlenmeyer de 250 mL, sob agitação constante de 200 rpm a 37°C, ou 30°C para cepa SHuffle. A turbidez da cultura foi monitorada até atingir densidade óptica de 0,4 a 0,6 em 600 nm ( $D.O_{600nm}$ ). Nesse momento, as culturas foram induzidas com adição de IPTG (Isopropil-β-D-galactosídeo) em diferentes concentrações: 0,05 mM; 0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM. Durante a indução da expressão das astacinas recombinantes, as quatro cepas analisadas foram mantidas a 30°C e amostras foram coletadas a cada hora até finalizar 5h de expressão. Após a expressão, as culturas foram centrifugadas a 9000xg por 7 min, os pellets de células foram ressuspensos em tampão fosfato (50 mM  $NaH_2PO_4$  pH=8,0 e 500 mM NaCl), com 1 mg/mL de lisozima e mantidos em refrigerador -20°C por 16 h. Essas amostras foram descongeladas, lisadas por 5 ciclos de 30s de sonicação (Unique Cell Disruptor) em potência 80, com intervalos de 20 s em gelo, centrifugadas a 9.000xg por 30 min. O sobrenadante formado é composto de todas as proteínas solúveis e o precipitado contém proteínas insolúveis e todos os *debris* celulares. Todas as amostras dos testes de expressão, desde o tempo anterior à indução, as amostras

de cada hora de indução e as amostras das proteínas solúveis após 5h de indução foram preparadas com tampão *Laemmli* com 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% com voltagem constante (200 V). Após a corrida, os géis foram corados com solução corante Azul Brilhante de Coomassie 0,02% (p/v) dissolvido em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água deionizada quantidade suficiente para completar 100% (v/v), descorados com metanol 50%, analisados e comparados.

Após a análise dos testes de expressão nas quatro diferentes cepas e nas concentrações de IPTG, foram realizados testes de expressão com a melhor concentração de IPTG para cada cepa alterando as temperaturas de indução, na tentativa de obter as astacinas solúveis: 4 h a 25°C e 16 h a 16°C. Esses testes foram realizados da maneira descrita acima e as amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12,5%.

### 3.3.2.3 Expressão das astacinas recombinantes em larga escala em vetor pET-SUMO

Para expressão em larga escala, uma colônia isolada contendo a construção de interesse foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo kanamicina (50  $\mu$ g/mL) e cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL) por 16h a 37 °C, com agitação constante de 200 rpm. A cultura saturada foi inoculada na diluição de 1:100 em 1 L de meio LB contendo antibióticos. Quando a cultura atingiu absorvância entre 0,4 e 0,6 foi adicionado o indutor IPTG na concentração de 0,1 mM e a cultura incubada por 3 h a 30°C. Ao término da expressão, a cultura foi resfriada em banho de gelo, centrifugada (9000 x g, 9 minutos) e o “pellet” foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -20°C por 16h.

### 3.3.2.4 Cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose

A purificação das astacinas recombinantes expressas foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni<sup>2+</sup>-NTA. A suspensão de células foi descongelada e lisada por 5 ciclos de 30s de sonicação em 80% da potência máxima, com intervalos de 20 s em gelo. O lisado foi centrifugado (9000xg, 15 minutos) e o sobrenadante incubado por 1 h a 4°C com resina Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose em agitação moderada. A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM), sendo a absorbância em 280 nm monitorada durante todo o procedimento de purificação. A lavagem foi finalizada quando a absorbância atingiu 0,01. A eluição foi realizada utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM) e foram coletadas frações de 500 µL, as quais foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% sob condições redutoras e as frações concentradas e puras foram reunidas e dialisadas contra PBS pH 7,2.

### 3.3.2.5 Redobramento “in vitro” das astacinas recombinantes superexpressas em cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS

#### 3.3.2.5.1 Superexpressão da LALP1 e LALP2

Realizamos testes de superexpressão da LALP1 e LALP2 para otimizar a expressão de grande quantidade de proteína, induzindo a formação de corpos de inclusão para utilizá-los em diferentes métodos de redobramento “in vitro”. Inicialmente, foram feitos pré-inóculos de uma colônia de BL21(DE3)pLysS transformada com cada uma das construções de interesse (LALP1/pET-14b e LALP2/pET-14b) em 5 mL de LB líquido. Essas culturas saturadas (após 16h a 37°C) foram diluídas 1:100 em meio LB líquido novo, a turbidez foi monitorada até atingir D.O<sub>600nm</sub> entre 0,4 - 0,6. As culturas foram resfriadas em banho de gelo, uma amostra de cada foi coletada (tempo antes da indução) e as culturas foram induzidas com 0,1; 0,5; 1,0 e 2,5 mM de IPTG. Amostras foram coletadas a cada hora e a indução foi finalizada ao completar 5h sob constante agitação a 30°C. A quantidade de IPTG ideal para atingir uma superexpressão das astacinas de interesse foi analisada através da quantidade de proteína expressa em cada condição, com

preparo das amostras com tampão *Laemmli* com 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5%.

#### 3.3.2.5.2 Redobrimento “in vitro” em coluna $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarose

O primeiro método de redobramento in vitro testado foi em coluna  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarose. Para tanto, foram realizadas expressões em larga escala, nas quais 12 mL de pré-inóculo saturado foi utilizado para preparar um inóculo de 1 L para cada isoforma. Esses inóculos foram monitorados e induzidos com D.O.<sub>600nm</sub> entre 0,4 e 0,6 com 1,0 mM de IPTG sob agitação constante 200 rpm a 30°C. Após o tempo de indução de 5h, as culturas foram resfriadas em banho de gelo, centrifugadas a 9.000xg por 7 min e os pellets foram ressuspensos em 20 mL de tampão de ligação desnaturante (fosfato sódico 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 10 mM e ureia 8 M), esse volume foi separado em dois tubos e em um deles foi adicionado 1 mM de DTT (ditiotreitól) e ambos foram congelados a -20°C. Após 16 h, a lise foi realizada por sonicação com 5 ciclos de 30s em potência 80, com intervalos de 20 s. Os lisados foram centrifugados a 9.000xg por 30 min e a superexpressão foi avaliada em SDS-PAGE 12,5%. Em cada lisado (com ou sem DTT) foram adicionados 10 mL de tampão de ligação desnaturante antes de serem incubados com 1 mL da resina Ni-NTA agarose por 1 h à temperatura ambiente. Nessas condições, o lisado com DTT foi incubado com a resina em concentração de 0,5 mM do agente redutor. As resinas após empacotadas nas colunas, foram lavadas com tampão de lavagem desnaturante (fosfato sódico 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, ureia 8 M, com e sem 0,5 mM de DTT) até D.O.<sub>280nm</sub> ficar constante ou atingir 0,001. Para o redobramento propriamente dito, foram utilizados 7 tampões de lavagem com quantidades decrescentes de ureia (7 M, 6 M, 5 M, 4 M, 3 M, 2 M e 1 M) e para a coluna com agente redutor, as concentrações de DTT em cada tampão também foram decrescentes (0,4 mM; 0,35 mM; 0,3 mM; 0,25 mM; 0,2 mM; 0,15 mM; 0,1 mM). O volume utilizado de cada tampão de redobrimento foi de 30 vezes o volume da resina, ou seja, foram utilizados 30 mL de cada tampão nas duas condições testadas (com ou sem agente redutor). Após os tampões para redobrimento, as colunas foram lavadas com tampão de lavagem nativo (fosfato sódico 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM) até D.O.<sub>280nm</sub> atingir 0,001. As eluições foram feitas com tampão de eluição nativo (fosfato sódico 50 mM, NaCl 500

mM, imidazol 250 mM) e frações de 1 mL foram monitoradas em espectrofotômetro 280nm. Todas as frações com D.O.<sub>280nm</sub> entre 0,1 e 0,4 foram analisadas em SDS-PAGE 12,5%.

#### 3.3.2.5.3 Redobramento “in vitro” por diluição rápida

Inicialmente, após superexpressão das astacinas descrita no item acima, os pellets das culturas foram ressuspensos em 25 mL de Tris 50 mM, pH 8,0 e congelados em freezer -20°C por 16 h. Após descongelado, foram realizados 8 ciclos de 20s em sonicador em potência média, com intervalos de 20s em gelo. O lisado foi centrifugado a 9.000xg por 30 min e o sobrenadante foi descartado. Para realizar o redobramento in vitro das astacinas produzidas em corpos de inclusão, o pellet contendo os corpos de inclusão foi submetido a 3 lavagens com tampão contendo 50 mM Tris pH 8,0; 5% Triton X-100 e 1 mM EDTA, seguidas de centrifugação a 5.000xg por 10 min. Os corpos de inclusão lavados foram ressuspensos em 24 mL de tampão contendo 50 mM Tris pH 8,0; 1 M Ureia e 1 mM EDTA e incubados a 37°C por 30min sob agitação. Após nova centrifugação a 5.000xg por 10min, o pellet foi ressuspensionado em 24 mL do mesmo tampão, mas dessa vez contendo 8 M Ureia e 0,1 mM β-mercaptoetanol, seguido de incubação a 37°C por 1 h e logo após foi centrifugado a 9000xg por 30 min. O pellet que após todos esses procedimentos de lavagem deve conter em sua grande maioria a proteína recombinante de interesse, foi solubilizado em tampão 50 mM Tris pH 8,0; 8 M Ureia; 1 mM EDTA e 0,1 mM β-mercaptoetanol em volume suficiente para que a concentração de proteína ficasse igual a 10 mg/mL.

Para o teste das melhores condições de redobramento da LALP1 em microplaca utilizamos tampão Tris-HCl 50 mM em pH 7,5; 9,5; 10,5 e 11,5. Nesses tampões foram utilizados diferentes proporções de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (1:10, 10:1 e 1:2) na presença e ausência de L-arginina (0,5 M ou 1M). O teste consistiu em utilizar os corpos de inclusão depois das lavagens e solubilizados em Tris 50 mM pH 8,0 contendo Ureia 8 M e a concentração proteica ajustada para 10 mg/mL. Os diversos tampões foram preparados e, primeiramente, foi pipetado 10 µL da proteína e 190 µL de cada tampão em seus respectivos poços (foi realizado triplicada de cada condição) e homogeneizados várias vezes. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 30 e 60 min e a absorbância em

cada horário foi lida em leitor de microplaca em 360 nm (TECAN, Mönnedorf, Zurique, Suíça). A leitura obtida de cada variável foi descontada em 0,2, que é a absorbância referente aos poços vazios (plástico). As leituras mais próximas a zero correspondem aos tampões em que a solubilidade da proteína de interesse foi atingida, uma vez que valores mais altos de absorbância indicam a presença de agregados proteicos. As três condições com as mais baixas absorbâncias obtidas foram utilizadas para o redobramento propriamente dito. Para tanto, a proteína em tampão 50 mM Tris pH=8.0, 8 M Ureia, 1 mM EDTA, 0,1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol foi diluída em 50 mL dos diferentes tampões de redobramento. Foram testadas quatro diluições 1:1000, 1:100, 1:50 e 1:20 e as soluções foram mantidas sob agitação branda, a 4°C por 24 h. Ao final do redobramento, a proteína foi dialisada contra 50 mM Tris-HCl pH 8.00.

Além dos testes descritos acima, foi utilizado tampão de redobramento descrito para redobramento de diferentes astacinas recombinantes (Reyda *et al*, 1999; Yiallourous *et al.*, 2000). A proteína, preparada da mesma maneira descrita acima, foi diluída 1:100 e 1:50 em tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,00; 1 mM GSH; 0,1 mM GSSG e 0,8 M l-arginina. Após incubação de 24 h a 4°C, a proteína foi dialisada contra 50 mM Tris-HCl pH=8.0 com ou sem 0,1 mM  $\text{ZnSO}_4$ .

### 3.3.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas foi realizada baseada no método do Azul de Coomassie, descrito por BRADFORD (1976). Utilizou-se a solução corante Reativo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em microplacas, o que reduz o gasto de proteína no momento da dosagem e aumenta a sensibilidade do método. As amostras proteicas foram submetidas à diluição seriada em água MiliQ (1:10, 1:100, 1:1000), a proteína padrão soroalbumina bovina (BSA) foi diluída em água MiliQ atendendo gradiente linear de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,0  $\mu\text{g/mL}$ . Em placa de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram colocados 20  $\mu\text{L}$  tanto das amostras de proteína padrão quanto das proteínas de concentração desconhecida. Para a leitura do branco foi utilizado 20  $\mu\text{L}$  de água MiliQ e todas as amostras foram feitas em duplicata. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do reativo de Bradford e após incubação de 5 min à temperatura ambiente, as absorbâncias das reações colorimétricas foram mensuradas em leitor de ELISA

(Meridiam ELX 800) com filtro 610 nm programado para descontar a leitura do branco das leituras das amostras de interesse e calcular a curva a partir das concentrações da proteína padrão.

#### 3.3.4 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Eletroforeses de proteínas foram realizadas em géis de poliacrilamida com SDS (dodecil sulfato de sódio) em condições redutoras (5%  $\beta$ -mercaptoetanol) e não redutoras. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante de 200 V e para detecção de proteínas, os géis foram corados com Azul Brilhante de Coomassie 0,02% (p/v) dissolvido em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e água deionizada quantidade suficiente para completar 100% (v/v).

#### 3.3.5 ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO (“WESTERN BLOTTING”)

A análise das expressões das proteínas recombinantes e das frações solúveis foram analisadas em ensaios de “Western Blotting”. Para tanto, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética (SDS-PAGE) e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 16 h à voltagem constante 25 V. Em seguida as membranas foram bloqueadas com leite desnatado em pó diluído em PBS 3% (p/v) por 1h e incubadas com IgG hiperimune anti-LALP1 (diluído na mesma solução de bloqueio) ou com IgG anti-6xHis (Qiagen) por 2 h à temperatura ambiente e sob constante agitação. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão na ausência de anticorpo e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM).

#### 3.3.6 ATVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE FIBRONECTINA E FIBRINOGENIO

Moléculas matriciais (MEC) foram incubadas com as isoformas de astacinas recombinantes ou com o veneno total em diferentes proporções, toxinas ou veneno:substratos de 1: 12,5; 1:5 e 1:2, a 37°C por 16 h. As moléculas digeridas e

os controles foram analisados em eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida.

### 3.3.7 ENSAIOS DE ZIMOGRAMA

Os zimogramas foram feitos usando SDS-PAGE 12%, contendo 3 mg/ml de gelatina (Sigma). Amostras em estudo foram diluídas em tampão Laemmli não redutor e submetidas à eletroforese. Os géis foram lavados 3 vezes de 25 min em Triton X-100 2,5% e incubados à 37°C em tampão ótimo para atividade enzimática (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ZnSO<sub>4</sub>). Os géis foram corados com corante Azul de Coomassie e descorados com trocas sucessivas de metanol 50% (v/v). As bandas claras lisadas do substrato contra um fundo de coloração azul indicaram a presença da degradação enzimática (proteases).

### 3.3.8 ENSAIOS DE AUTODEGRADAÇÃO

Para avaliar a atividade de autodegradação, amostras de 5µg da LALP1 foram incubadas a 37 °C em tampão fosfato na presença ou ausência de 0,05 mM de ZnSO<sub>4</sub>. Após os tempos de incubação de 15min, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h, as amostras foram diluídas em tampão *Laemmli* redutor e submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 12,5%. Os géis foram corados com corante Azul de Coomassie e descorados com trocas sucessivas de metanol 50% (v/v).

### 3.3.9 PREDIÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DA LALP1 E LALP2

As predições das estruturas tridimensionais das proteínas LALP1 e LALP2 foram realizadas com o auxílio do software de modelagem Swiss Model Automatic Modelling Mode disponível em <http://swissmodel.expasy.org> (Peitsch, 1995; Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009). A estrutura utilizada para a realização da modelagem das LALPs foi a astacina de *Astacus astacus* (código PDB:1AST) (Gomis-Ruth *et al.*, 1993b). A visualização das estruturas foi realizada no software para visualização molecular “opensource” Open Astex Viewer 3.0 (Astex Therapeutics Ltd., Cambridge, Reino Unido), disponível em <http://openastexviewer.net/web/>.



### 3.4 RESULTADOS

Para obtenção das astacinas recombinantes solúveis e biologicamente ativas em quantidades suficientes para realização dos ensaios de atividade biológica, realizamos diferentes estratégias de expressão heteróloga e de redobramento “in vitro”.

#### 3.4.1 TRANSFORMAÇÃO DE CEPAS DE *E. coli* E OTIMIZAÇÃO DE EXPRESSÃO NA FRAÇÃO SOLÚVEL DA LALP1 E LALP2 EM pET-14b

As construções de LALP2/pET-14b e LALP1/pET-14b (já existente no laboratório) foram utilizadas para transformações de diferentes cepas de *E. coli* (BL21 (DE3) pLys-S, AD494, *Rosetta gami* e SHuffle T7 Express Lys Y). Na figura 10 estão as sequências nucleotídica e aminoacídica da LALP2, com o domínio catalítico e a volta de metionina destacados.

LALP2	
1	GTCTCCCTTACCTAATATGATCCCTGACGTAGGCTTCCTCGTTCTCCTAACAGGAGCCCTTTTCATATGCATAAAAGCAGCTCCA
1	<u>M I P D V G F L V L L T G A L F I C I K A A P</u>
86	GCCACTACCGATGTTGATCCTACCTTTGAAGGGAGAATTGTTATGGAGGGAGACATCCTTATTCGTGAG
24	<u>A T T D V D P T F E G R I V M E G D I L I R E</u>
155	GAACAATTAACGGAAACGAAACGCCATCGCTCTCGAGAATATGCGCTGGCCAGATGCTACTATAGTTTAC
47	<u>E Q L T E R N A I A L E N M R W P D A T I V Y</u>
224	AAACTCACTGGCTGGTAGCGACTTTTTCAGGAGATATTAAGCTATGCGTCACATTGAAGAAAAC
70	<u>K L T G W Y A L F P G D I K K A M R H I E E N</u>
293	ACTTGCATTAAAGTTCAAGGCAAGCAACGAAGAGGGTTACGTTAAATCTACAAGGGTGAAGAGAA
93	<u>T C I K F K A R S N E E G Y V K I Y K G E K E</u>
362	TCATGCTTCGCTGACATTGGATACTTTGCTTCGGAACAGCGGCTGTCTTTGGGAAGCGGTTGCAAAATA
116	<u>S C F A D I G Y F A S E Q R L S L G S G C K I</u>
431	TTTGGTGCATTCTGCACGAATGGGTCACACTATTGGATTGTTCCATGAGCACACAGACCCGACAGA
139	<u>F G R I L H E M G H T I G L F H E H T R P D R</u>
500	GACAACATCACTGTCCATGAGGATAACATTAGGCCGGGCTCTAAAGGAATTACAGGAAAACCTCCA
162	<u>D N Y I T V H E D N I R P G S K R N Y R K T P</u>
569	TCCTATATGACACGCGTCATTGGCCCATTCGATTACGATTCAATCATGATCTACGGAGAGACGGCTGGC
185	<u>S Y M T R V I G P F D Y D S I M I Y G E T A G</u>
638	TCTAGAGACCCAAATGCACCTTGAAGTCAATGGAGGCAATAAGCCTGGAGTCACGCTGATCAGTTACGG
208	<u>S R D P M H L K S M E A N K P G V T L I S S R</u>
707	TACAAGGACAGGTTGACTGACTTGGACATCAAGAAATCAATACTCTGTACAACGTCCGGGCAAGGAA
231	<u>Y K D R L T D L D I K K I N T L Y N C P G K E</u>
776	AAATTTAGTTAAACCCCTTGTGTTTCTGAATTGCACTCCTTGAAAATATAAAATTATCTCGATAAAAA
254	<u>K F S *</u>
845	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 10: SEQUENCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DEDUZIDA DA LALP2. O resíduo de asparagina que indica o início da proteína madura está destacado por um quadrado. No retângulo está o domínio catalítico da família das astacinas e a volta de metionina com os resíduos conservados destacados em preto.

Um clone transformante de cada cepa foi utilizado para crescimento em meio líquido (pré-inóculo e inóculo) e realização testes de expressão e solubilidade, em

diferentes condições de expressão (variando quantidade de indutor - IPTG -, tempo e temperaturas de indução). A massa molecular predita utilizando a ferramenta ProtParam do EXPASY para a construção 6xHis/LALP1 é 27,9 kDa e para 6xHis/LALP2 é 26,8 kDa. A LALP1 (Figura 11) e a LALP2 (Figura 12) foram expressas a 30°C e obtivemos expressões em todas as concentrações de IPTG testadas. Nas figuras 11 e 12, as expressões da LALP1 e LALP2 são observadas logo abaixo do marcador de massa de 29 kDa, com bandas crescentes ao longo do tempo e das concentrações de IPTG.

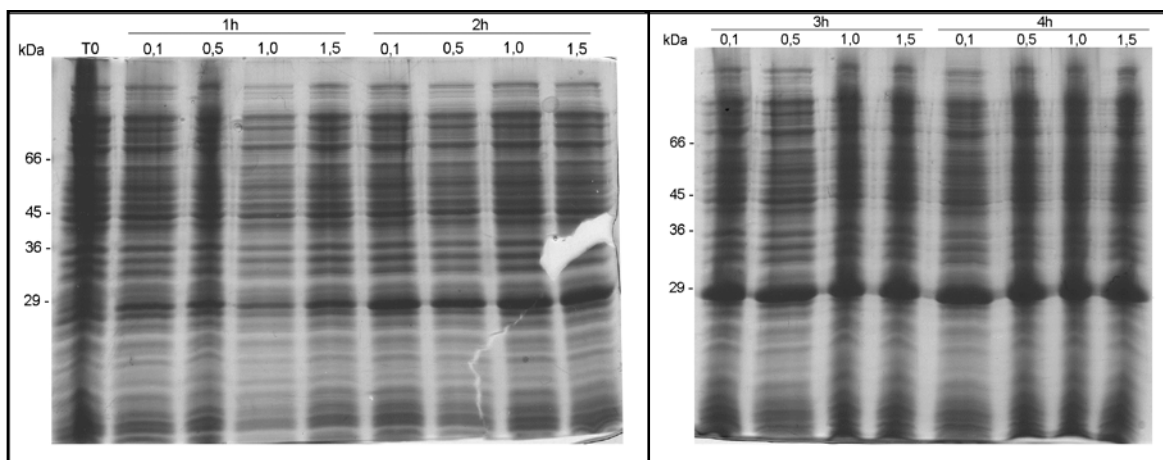


Figura 11: TESTES DE EXPRESSÃO DA LAP1 EM SHuffle T7 Express Lys Y. A indução da expressão foi realizada a 30°C e nos tempos 1, 2, 3 e 4h indicados na parte superior do gel. As concentrações de IPTG (mM) utilizadas estão descritas na parte superior do gel. À esquerda estão as posições dos marcadores de massa molecular em kDa.

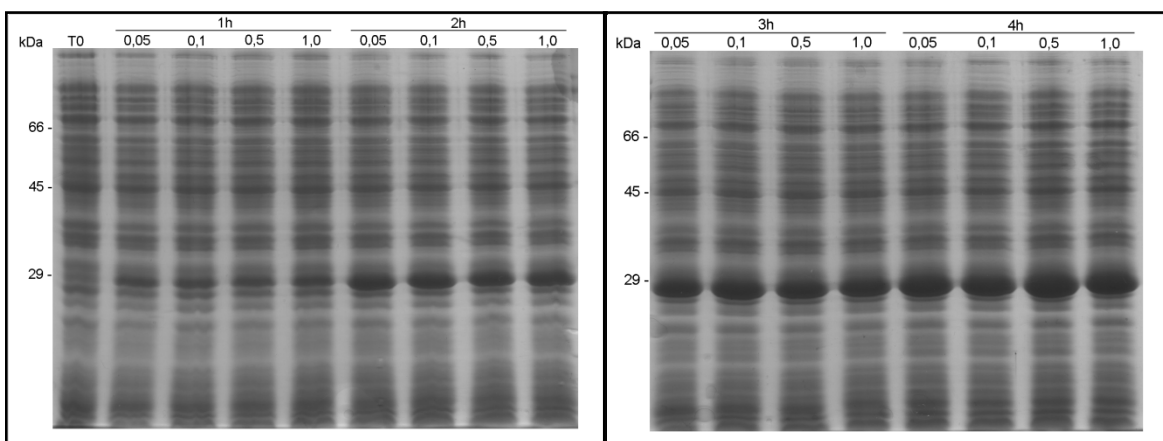


FIGURA 12: TESTES DE EXPRESSÃO DA LALP2 EM SHuffle T7 Express Lys Y. A indução da expressão foi realizada a 30°C e nos tempos 1, 2, 3 e 4h indicados na parte superior do gel acima do traço. As concentrações de IPTG (mM) utilizadas estão escritas na parte superior do gel abaixo do traço. À esquerda estão as posições dos marcadores de massa molecular em kDa.

Porém, após lise das bactérias com lisozima e sonicação, observamos que as toxinas recombinantes não estavam solúveis, não sendo observada banda correspondente à toxina na fração solúvel (Figura 13).

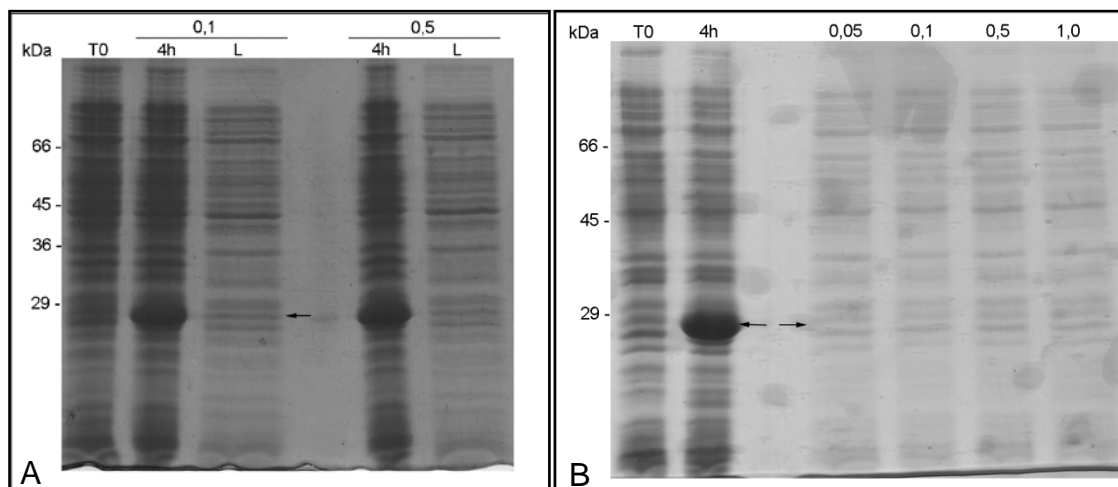


FIGURA 13: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA LALP1 E LALP2 EM SHuffle T7 Express Lys Y. (A) Amostras do tempo antes da indução (T0), após a indução (4h) e da fração solúvel (L) das culturas da expressão da LALP1 em duas concentrações de IPTG (0,1 e 0,5 mM). (B) Amostras do tempo antes da indução (T0), após a indução (4h) e das frações solúveis (L) das culturas da expressão da LALP2 em quatro concentrações de IPTG (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mM). À esquerda estão as posições dos marcadores de massa molecular em kDa.

Os mesmos testes representados nas figuras 11, 12 e 13 foram realizados para todas as cepas e essas figuras exemplificam os resultados que obtivemos em todos os protocolos e cepas utilizadas. O que variou nesses testes foi a quantidade de proteína recombinante expressa, sendo que em algumas condições e cepas obtivemos menor ou maior expressão, mas em todos os testes as toxinas não foram identificadas na fração solúvel (dados não mostrados). A literatura descreve que diminuindo a temperatura de expressão, a taxa de expressão é menor e, consequentemente, minimiza o estresse gerado com a expressão da proteína recombinante, melhorando a solubilidade da proteína de interesse (Sorensen e Mortensen, 2005). Portanto, tentamos expressões utilizando temperaturas mais baixas (25°C, 20°C e 16°C). Porém, nos experimentos com a LALP1 e LALP2 em pET-14b e nas 4 cepas utilizadas não observamos aumento da fração solúvel com a utilização de temperaturas menores (dados não mostrados).

### 3.4.2 REDOBRAMENTO “IN VITRO”

#### 3.4.2.1 Redobramento em resina Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose

Como as tentativas de expressão em diferentes cepas, e em diferentes condições, não foram eficazes para obtenção das astacinas LALP1 e LALP2 na forma solúvel, optamos por tentar o redobramento *in vitro* dessas toxinas. O primeiro

método de redobramento *in vitro* testado foi em coluna Ni-NTA agarose, no qual é realizada a ligação da proteína em condições desnaturantes e no momento da lavagem da coluna são passados lentamente vários tampões com concentrações decrescentes de agente caotrópico (uréia ou guanidina) e redutor (DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol), e a eluição é feita em condições nativas (sem agente desnaturante e redutor). Fizemos testes na presença e na ausência de agente redutor (DTT). Primeiramente, realizamos testes de superexpressão da LALP1 em BL21(DE3)pLysS para otimizar a expressão de grande quantidade de proteína, induzindo a formação de corpos de inclusão. A superexpressão da LALP1 foi efetiva em todas as concentrações de indutor testadas (Figura 14) e a quantidade foi crescente ao longo do tempo de indução. A concentração de IPTG escolhida para realizar a superexpressão em larga escala foi de 1,0 mM a 30°C e o tempo de expressão de 5 horas (Figura 14), pois nessa condição temos uma expressão grande de proteína recombinante e um gasto de IPTG menor do que na concentração de 2,5 mM, a qual também apresentou uma expressão grande de proteína até em tempos menores do que o escolhido (3 e 4 h).

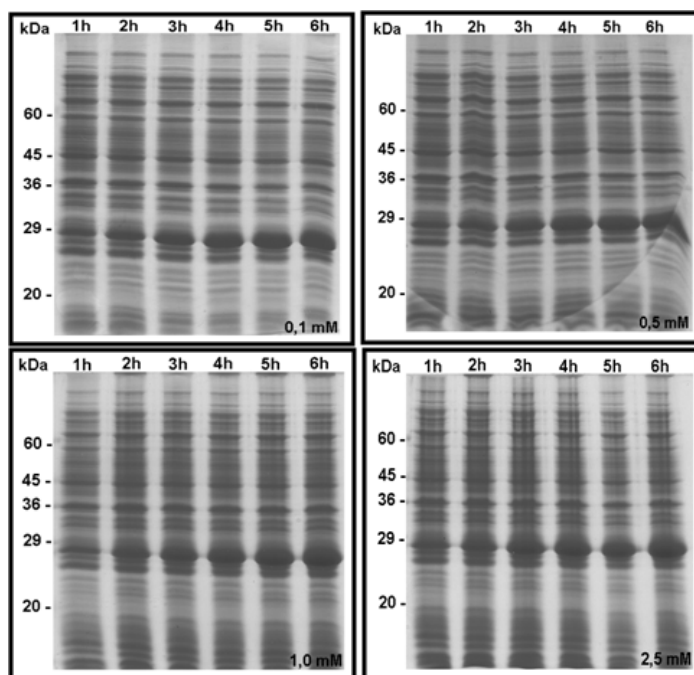


Figura 14: Avaliação do teste de superexpressão da LALP1. A LALP1 foi expressa a 30 °C, em 4 diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5; 1,0 e 2,5 mM) e amostras foram coletadas a cada hora após a indução. As amostras foram preparadas em condições redutoras e foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12,5%. Nas figuras, no lado esquerdo dos géis estão indicadas as posições dos marcadores de massas moleculares

Realizamos a super-expressão das toxinas em larga escala, centrifugamos a cultura, o pellet foi ressuscitado em 20 mL de tampão de ligação desnaturante e separado em dois tubos, sendo que em um deles foi adicionado 1 mM de DTT e ambos foram congelado a -20°C. Após 16 h, a lise foi realizada por sonicação, o lisado foi centrifugado e a expressão foi avaliada em SDS-PAGE para decidir quanto de resina utilizar na purificação e redobramento (Figura 15). Isso porque, para realizar redobramento em coluna é necessário conciliar uma quantidade de resina que seja suficiente para fornecer condições para as moléculas protéicas experimentarem diferentes conformações ao longo do processo e não estarem muito próximas, dificultando a agregação e precipitação e, ao mesmo tempo, que seja ideal para uma boa purificação.

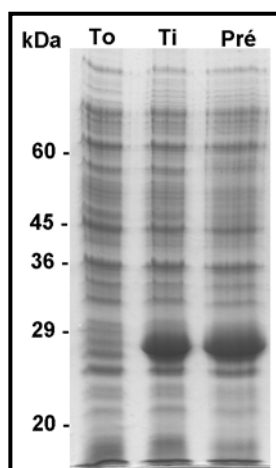


FIGURA 15: Avaliação da overexpressão em larga escala.

À esquerda estão as posições dos marcadores de massa molecular em kDa. T0 - cultura bacteriana antes da expressão; Ti - cultura bacteriana 5 horas após adição de IPTG; Pré - lisado bacteriano, contendo a fração de proteínas insolúveis dos corpos de inclusão que foram solubilizados no tampão desnaturante (uréia 8 M).

Analizada a quantidade de proteína expressa observada no SDS-PAGE, a quantidade de resina utilizada para cada lisado foi de 1 mL. O volume destes lisados foi elevado para 20 mL antes de serem incubados com a resina por 1 h à temperatura ambiente. As resinas, após serem empacotadas nas colunas, foram lavadas com tampão de lavagem desnaturante até a  $D.O_{280nm}$  ficar constante ou atingir 0,001. Para o redobrimento propriamente dito, foram utilizados os 7 tampões de lavagem com quantidades decrescentes de ureia. Na coluna utilizada com a proteína na presença de agente redutor, as concentrações de DTT em cada tampão também foram decrescentes, como descrito no item materiais e métodos. Após os tampões para redobrimento, as colunas foram lavadas com tampão de lavagem nativo até a  $D.O_{280nm}$  atingir 0,01, e as eluições foram feitas com tampão de eluição nativo (fosfato sódico 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM) e a  $D.O_{280nm}$  das frações de 1 mL foi monitorada em espectrofotômetro. Na condição com DTT não houve eluição da proteína, sendo que as leituras obtidas foram iguais a zero, isso porque, possivelmente, as moléculas protéicas sofreram precipitação na coluna durante a retirada de uréia e DTT. Já na eluição da condição sem DTT obtivemos um pico de eluição na terceira fração ( $D.O_{280nm} = 0,320$ ) e após a sexta fração a  $D.O_{280nm}$  zerou. As quatro frações foram avaliadas em SDS-PAGE (Figura 16) e constatamos que a proteína ficou solúvel, o redobrimento foi eficiente para solubilidade, e todas as frações apresentaram o mesmo perfil. As bandas abaixo de 28 kDa, observadas no gel, provavelmente são contaminantes bacterianos, produtos de degradação por proteases das bactérias ou ainda produtos de autodegradação da LALP1.

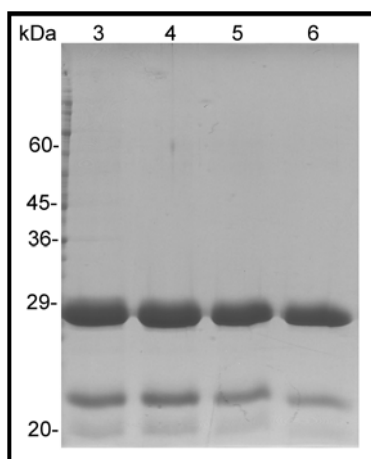


FIGURA 16: FRAÇÕES PURIFICADAS APÓS *REFOLDING* EM RESINA  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA AGAROSE. Amostras das quatro frações eluídas foram preparadas em condições redutoras e submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12,5%. As posições dos marcadores de massas moleculares (kDa) estão à esquerda e as 4 colunas são referentes as 4 frações da eluição.

Para avaliar a atividade da LALP1 solúvel, as amostras foram reunidas, dialisadas contra PBS1x, dosadas por método de Bradford e submetidas a ensaios de zimograma de gelatina. Nesse ensaio foram utilizadas duas concentrações da LALP1 (3  $\mu\text{g}$  e 6  $\mu\text{g}$ ) e 2  $\mu\text{g}$  do veneno total de *L. intermedia* (controle positivo) (Figura 17). No gel é possível observar bandas brancas de degradação da gelatina no veneno. Nas amostras de LALP1, apesar das bandas serem muito fracas, é possível verificar que a LALP1 apresentou atividade gelatinolítica após o redobramento em coluna.

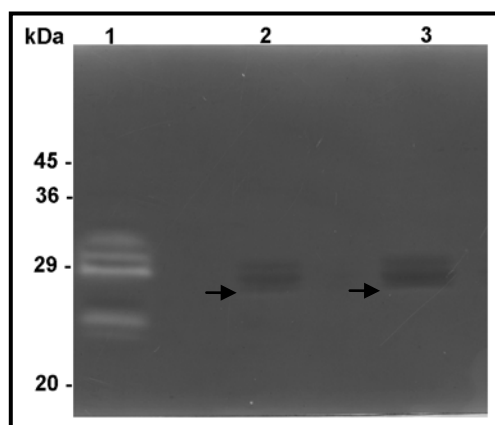


FIGURA 17: ZIMOGRAMA DE GELATINA DA LALP1 APÓS REDOBRAMENTO EM COLUNA. As amostras foram preparadas em condições não redutoras e submetidas a corrida eletroforética SDS-PAGE 12,5% copolimerizado com gelatina (3 mg/mL). O gel foi lavado duas vezes com 1% de Triton X-100 e incubado por 16h em tampão ótimo (Tris 50mM pH=7,4; NaCl 200mM;  $\text{CaCl}_2$  0,5mM;  $\text{MgCl}_2$  0,5mM;  $\text{ZnCl}_2$  0,5mM) (1) Controle positivo da reação, 3 $\mu\text{g}$  de veneno de *L. intermedia*. (2) 3 $\mu\text{g}$  da LALP1 e (3) 6 $\mu\text{g}$  da LALP1.

Com essa mesma amostra foram realizados ensaios de autodegradação (Figura 18) e de degradação de outros substratos, como fibronectina (Figura 19) e fibrinogênio (Figura 20). Infelizmente, não foi observada atividade sobre esses substratos e nem autodegradação, sugerindo que as bandas mais baixas observadas nas figuras 15 e 18 não são produtos de autodegradação, mas contaminantes bacterianos. A presença destas bandas desde o tempo zero na figura 18 reforça esta hipótese. Além disso, a amostra pode conter uma mistura de formas

solúveis ativas e inativas, devido a existências de formas mal enoveladas e corretamente enoveladas. A existência de diferentes formas da toxina poderia explicar a atividade somente frente à gelatina, pois as diferentes formas da toxina poderiam apresentar diferentes preferências de substrato. Essa mistura de formas é bastante comum em produtos de redobrimento “in vitro”, porque as moléculas protéicas adquirem várias formas intermediárias até conseguirem atingir a conformação mais estável (Burgess, 2009).

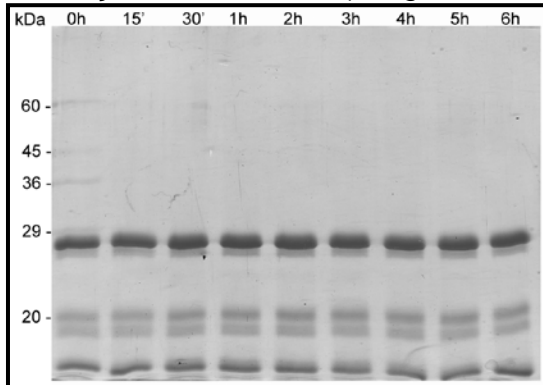


FIGURA 18: CINÉTICA DE AUTODEGRADAÇÃO DA LALP1.

Amostras de 5µg da LALP1 foram incubadas a 37 °C em tampão fosfato contendo 0,05 mM de ZnSO<sub>4</sub>. Após os tempos de incubação, as amostras foram preparadas em condições redutoras e submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12,5%. As posições dos marcadores de massa molecular estão à esquerda e cada coluna representa um dos tempos de incubação das amostras.

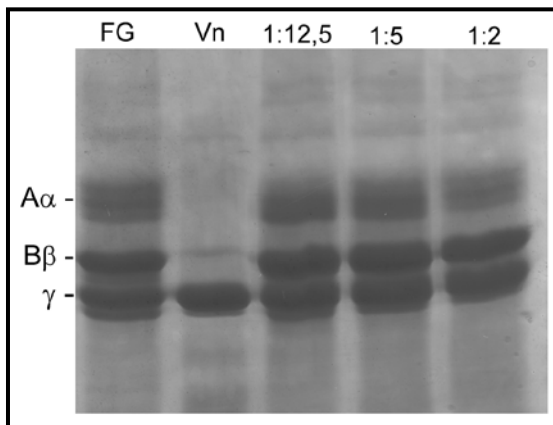


FIGURA 19: TESTE DE DEGRADAÇÃO DE FIBROGÊNIO PELA AÇÃO DA LALP1.

Amostras de fibrogênio (FG) foram incubadas com LALP1 em diferentes proporções enzima:substrato (1:25, 1:5 e 1:2) por 16 h a 37 °C. As amostras foram preparadas com tampão em condições redutoras e submetidas a SDS-PAGE 10%. À esquerda estão representadas as cadeias que compõem a molécula de FG. (FG) –fibrinogênio controle, (Vn) – FG incubado com veneno *L. intermedia* - controle positivo, (1:12,5; 1:5 e 1:2) FG incubado com LALP1.

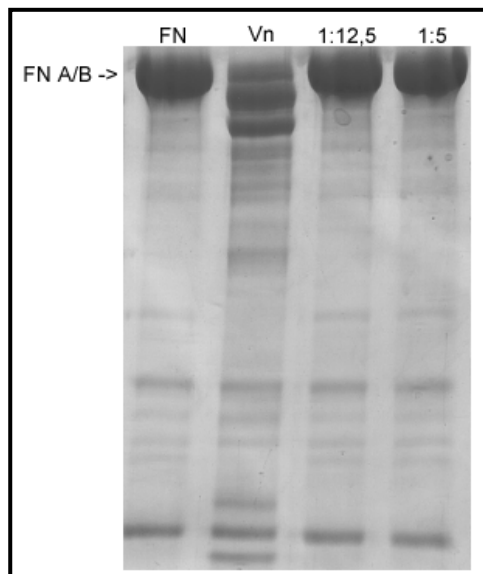


FIGURA 20: TESTE DE DEGRADAÇÃO DE FIBRONECTINA PELA AÇÃO DA LALP1.

Amostras de fibronectina humana (FN) foram incubadas com LALP1 em diferentes proporções enzima:substrato (1:25 e 1:5) por 16 h a 37 °C. As amostras foram preparadas com tampão em condições redutoras e submetidas a SDS-PAGE 7,5%. À esquerda está indicada a colocação das cadeias A e B da fibronectina. (FN) fibronectina controle, (Vn) - fibronectina incubada com veneno *L. intermedia* - controle positivo, (1:12,5 e 1:5) fibronectina incubada com LALP1 .



Outra hipótese levantada para esses resultados é a necessidade de zinco para a atividade da LALP1, uma vez que no ensaio de zimograma no tampão de incubação foi adicionado sulfato de zinco e nos ensaios com fibrinogênio e fibronectina este íon não foi adicionado. Para verificarmos essa possibilidade, repetimos os ensaios de atividade de LALP1 com adição de zinco, mas o mesmo perfil de ausência de atividade se repetiu (dados não mostrados). Ainda havia a possibilidade de que esse íon fosse necessário no momento de dobramento da molécula. Para avaliar essa hipótese, realizamos nova superexpressão e redobramento incluindo sulfato de zinco nos tampões de lavagem, de redobramento, de eluição e na diálise. Todos os testes de atividade foram repetidos e novamente nenhuma atividade foi observada, nem mesmo a degradação da gelatina em zimograma (dados não mostrados).

#### 3.4.2.2 Redobramento por diluição rápida

Como os resultados com redobramento em coluna não foram satisfatórios, optamos por mudar o método de redobramento para o de diluição rápida. Esse método consiste em obter a proteína de interesse livre da maioria dos contaminantes bacterianos por lavagens dos corpos de inclusão, já que esses são formados predominantemente pela proteína alvo. Após a lavagem, solubilizamos os corpos de inclusão em tampão contendo agente desnaturante (uréia, guanidina ou detergentes iônicos fortes) e, posteriormente, diluímos a proteína rapidamente em tampão para redobramento com pH pré-definido, na presença de pares oxido/redutores para auxiliar a aquisição das diferentes conformações experimentadas pela proteína recombinante.

Com intuito de definir as condições ideais do tampão de redobramento para a LALP1, realizamos um teste em microplaca de 96 poços que permite avaliar, de forma rápida e com baixo custo, diferentes composições do tampão de redobramento como: pH, concentração de sal, tipos e proporções do par oxido/redutor e de diferentes aditivos (Burgess, 2009).

Para o teste da LALP1 utilizamos tampão Tris-HCl 50 mM em pH 7,5; 9,5; 10,5 e 11,5. Nesses tampões foram utilizados diferentes proporções de glutathiona oxidada (GSH) e reduzida (GSSG) (1:10, 10:1 e 1:2), na presença e ausência de L-arginina (0,5 M ou 1M). Após 30 e 60 min da diluição das proteínas nos diferentes

tampões em placa de 96 poços, foi realizada a leitura em leitor de microplaca 360nm. A leitura obtida de cada variável foi reduzida em 0,2, que é a absorbância referente aos poços vazios (plástico). As leituras mais próximas a zero correspondem aos tampões em que a solubilidade da proteína de interesse foi atingida, uma vez que valores mais altos de absorbância indicam a presença de agregados proteicos. Os resultados obtidos no ensaio de microplaca estão mostrados no gráfico 2 e, no geral, as mais altas absorbâncias obtidas foram em pH 7,5 e as baixas foram em pHs mais alcalinos, indicando que a solubilidade da LALP1 foi melhor em pH 9,5; 10,5 e 11,5. Duas proporções de GSH:GSSG apresentaram as menores absorbâncias: 1:10 e 10:1. E para a L-arginina, as condições com 0,5 M foram melhores do que 1,0 M. Para realizar o redobrimento em escala maior, foram escolhidas as 3 condições com menores absorbâncias, porque muitas vezes o tampão em que a proteína atinge a maior solubilidade pode não condizer com atividade.

Para o redobrimento em escala maior preparamos tampões com pH 9,5; 10,5 e 11,5; cada um contendo 0,1 mM GSH, 1 mM GSSG e 0,5 mM L-arginina. A mesma solução da LALP1 EUAd no teste da microplaca foi diluída 50 vezes em cada tampão e mantida por 24 h a 4°C sob lenta agitação. Após o tempo de redobrimento, a solução foi dialisada contra Tris 50 mM pH 8,0 e 0,1  $\mu$ M de  $\text{ZnSO}_4$  e centrifugada a 9000 xg por 30 min a 4°C. Essa solução foi concentrada em Amicom® e dosada por Bradford. Foram realizados os mesmos ensaios de atividade feitos com o método de redobrimento descrito anteriormente. Novamente, nenhuma atividade da LALP1 foi observada (dados não mostrados). Testamos ainda a condição com proporção 10:1 de GSH:GSSG e obtivemos os mesmos resultados negativos. Essas 4 condições de redobrimento e atividade foram realizadas mais 2 vezes, utilizando soluções dos pares oxido/redutores recém preparadas em água ou em tampão Tris pH 50 mM pH 8,0 e o mesmo resultado foi obtido: a LALP1 atinge a solubilidade, mas não apresenta atividade proteolítica em nenhuma das condições avaliadas.

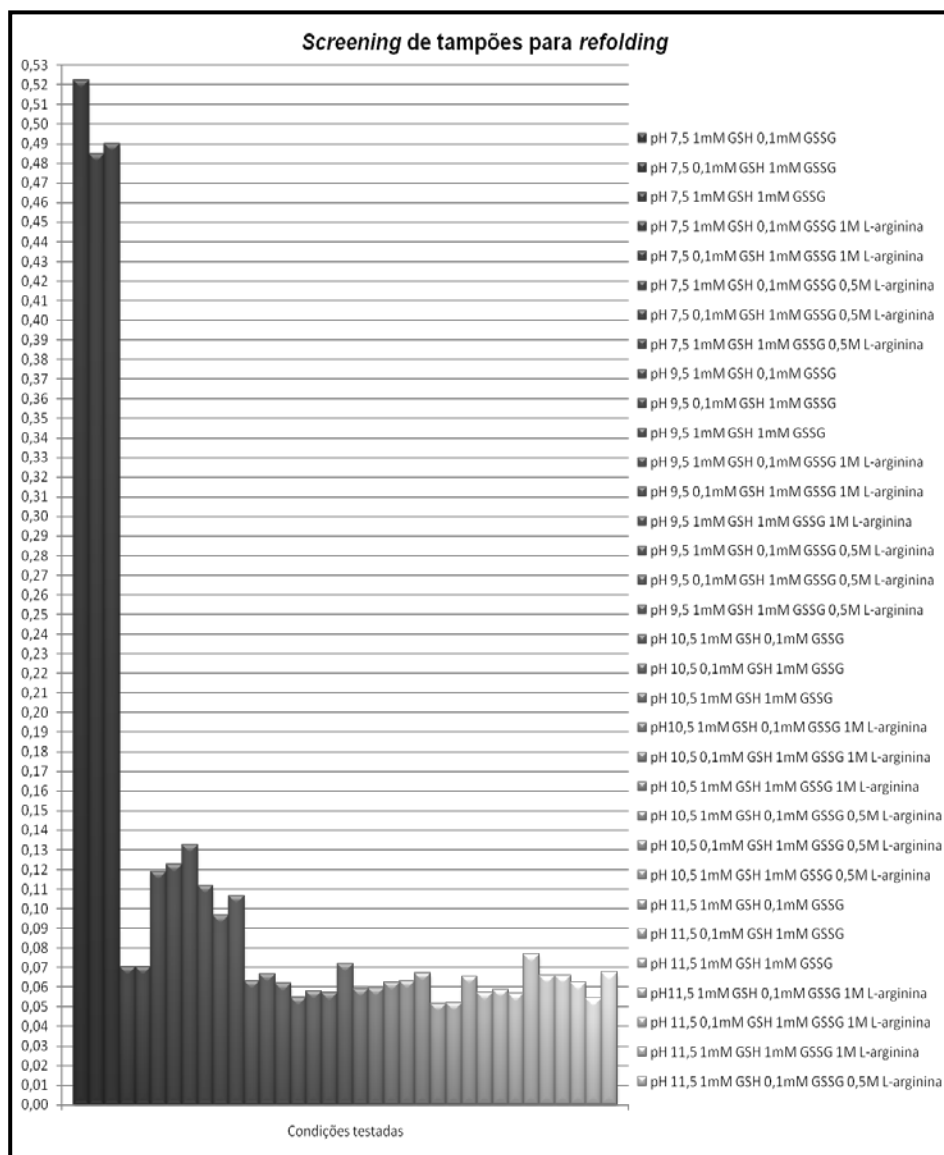


GRÁFICO 2: CONDIÇÕES DE TAMPÃO TESTADAS PARA REDOBRAMENTO “IN VITRO” POR DILUIÇÃO RÁPIDA. No eixo X estão as condições testadas (pH, concentração de GSH/GSSG e L-arginina). No eixo Y estão as absorbâncias obtidas em 230 nm.

Na literatura, existem três trabalhos publicados com astacinas recombinantes que utilizaram redobramento para obtenção da proteína ativa. Os três utilizam o mesmo método de redobramento, que difere do utilizado até agora para a LALP1 nos passos de lavagens e solubilização dos corpos de inclusão, na diluição da proteína (1000 vezes diluída no tampão de redobramento) e na quantidade de L-arginina (0,8 M) (Reyda *et al.*, 1999; Yiallourous *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2006). Realizamos exatamente o mesmo método utilizado por REYDA (1999), porém; durante as diálises foi observado precipitação da proteína e o rendimento de proteína solúvel após esse método foi irrisório (dados não mostrados). Durante as

repetições do método descrito por REYDA, ocorreu precipitação de L-arginina imediatamente após colocar a solução a 4°C no início da agitação. Para resolvermos esse problema, realizamos vários ensaios de redobramento com diferentes concentrações de L-arginina no tampão (0,55 M, 0,6 M, 0,7 M e 0,75M). Em nenhuma das condições testadas a LALP1 apresentou atividade frente aos substratos já descritos (dados não mostrados).

### 3.4.3 SUBCLONAGEM E OBTENÇÃO DAS ASTACINAS RECOMBINANTES UTILIZANDO VETOR DE EXPRESSÃO pET-SUMO

Dentre as inúmeras estratégias existentes para solucionar problemas de proteínas recombinantes insolúveis, decidimos testar a utilização da tecnologia de proteína de fusão. Existem disponíveis várias proteínas de fusão, que foram desenvolvidas com intuito de otimizar e simplificar a expressão e a purificação de proteínas recombinantes. Essa estratégia consiste em utilizar uma proteína de fusão (etiqueta) ligada à proteína de interesse por um sítio específico para uma protease. Dessa maneira, ao final da expressão é possível obter a proteína de interesse sem a proteína de fusão, utilizando a protease para clivar a ligação das duas proteínas. Essa estratégia de proteína de fusão fornece vantagens durante a expressão, como, aumentar a solubilidade e proteger a proteína de interesse de proteólise intracelular. Para expressão das astacinas com proteínas de fusão escolhemos trabalhar com vetor pET-SUMO. Ao utilizar esse vetor, a proteína de interesse será expressa com a proteína de fusão SUMO (small ubiquitin-like modifier), que é membro da família de proteínas do tipo ubiquitina. Estudos com SUMO como proteína de fusão mostram aumento nos níveis de expressão e aumento da solubilidade da proteína interesse (Satakarni e Curtis, 2011; Ma *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 2012).

As subclonagens dos cDNAs referentes a LALP1 e LALP2 em pET-SUMO foram iniciadas com reações de modificação de PCR de alta fidelidade com *Pfu* DNA polimerase e oligonucleotídeos específicos (Tabela 3). Obtivemos bom rendimento nas reações de PCR (Figura 21), os insertos foram extraídos do gel e foram submetidos à reação de adenilação.

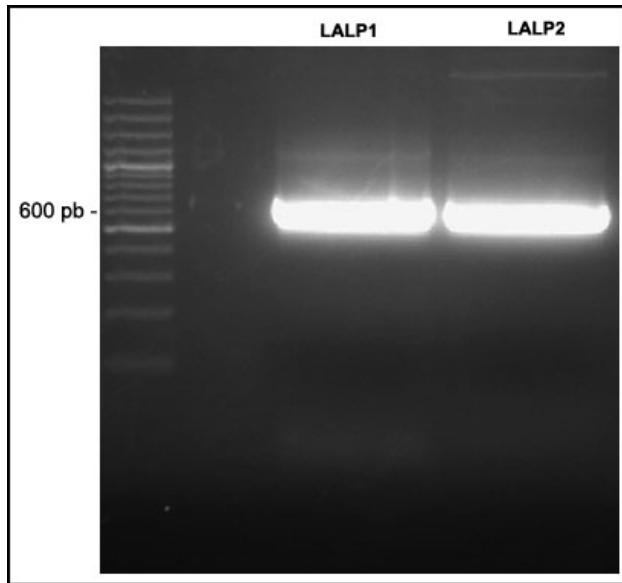


FIGURA 21: PCR DE MODIFICAÇÃO DO cDNA DA LALP1 E LALP2 COM *pFu* DNA POLIMERASE. Gel de agarose 2% mostra o produto da reação de PCR na altura aproximada de 600pb.

Após adenilação, foram realizadas as reações de ligação do inserto e vetor e células de *E. coli* Mach1 foram transformadas com o produto da ligação. Os clones transformantes foram avaliados em PCR de colônia com oligonucleotídeos do vetor, os resultados mostraram 8 clones positivos para LALP1 (Figura 22) e 9 clones positivos para LALP2.

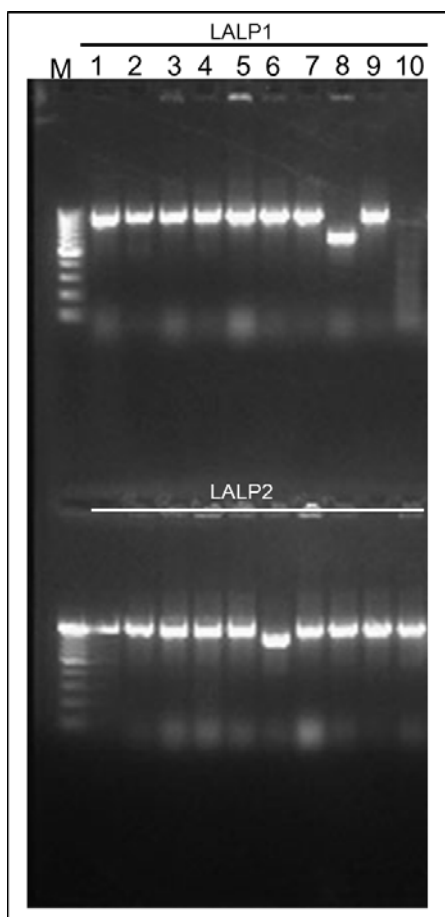


FIGURA 22: PCR DE COLÔNIA APÓS TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *E. coli* Mach1 QUIMIOCOMPETENTES COM PRODUTO DE LIGAÇÃO LALP1/pET-SUMO E LALP2/pET-SUMO. Os clones positivos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 da LALP1 apresentaram amplificação do inserto com bandas na altura de 1000 pb. Os clones positivos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 10 da LALP2 apresentaram amplificação do inserto com bandas na altura de 1000 pb. À esquerda estão os marcadores de pares de bases. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo.

Um clone de cada isoforma foi submetido à purificação dos plasmídeos recombinantes e foram realizadas as reações de PCR de sequenciamento. As análises dos sequenciamentos mostraram que o inserto da LALP2 foi inserido de forma correta, a fase de leitura foi mantida e não havia ocorrido alteração de bases nucleotídicas. Já, para o clone da LALP1, o inserto foi inserido de forma invertida. Realizamos PCR de colônia dos mesmos clones anteriormente testados da LALP1, mas com oligonucleotídeo sense do inserto (Tabela 3) e oligonucleotídeo reverse do vetor. Com essa estratégia, seria possível analisar quais clones estavam corretamente inseridos analisando apenas o tamanho do amplicon gerado. Realizamos triagem de vários outros clones da ligação e todos os clones testados estavam inseridos de maneira invertida. Fizemos novas ligações e não conseguimos subclonar a LALP1 em pET-SUMO. Portanto, demos continuidade aos ensaios somente com a construção LALP2/pET-SUMO, a qual foi utilizada para transformação de *E. coli* (BL21 (DE3) pLys-S. Um clone transformante foi utilizado

para crescimento em meio líquido (pré-inóculo e inóculo) e realização de testes de expressão e solubilidade em diferentes condições de expressão (0,1 mM; 0,5 mM e 1,0 mM de IPTG, a 25°C e a 30°C, por até 4 horas de expressão). A massa molecular predita para construção 6xHis/SUMO/LALP2 é 36,889 kDa (ProtParam-EXPASY). A expressão da proteína de fusão SUMO/LALP2 foi observada na temperatura de 30°C em todas as concentrações de IPTG testadas (Figura 23A, 23B e 23C) com banda de interesse na altura de aproximadamente 40 kDa. Na temperatura de 25°C foi observada pequena expressão da SUMO/LALP2, somente na maior concentração de indutor utilizada (1,0 mM) (Figura 23C).

Ao se analisar as frações solúveis em gel corado por Coomassie, é possível observar uma pequena quantidade de SUMO/LALP2 solúvel, na altura de aproximadamente 40 kDa (Figura 23A, 23B e 23C). Para confirmar esse resultado, realizamos um *western blotting* com anticorpo que reconhece a etiqueta de histidina presente na proteína recombinante expressa. O resultado do imunoenensaio mostra que realmente há presença de proteína recombinante na fração solúvel (Figura 23D), mas revela também, a expressão de proteínas com etiqueta de histidina com diferentes massas eletroforéticas aparentes (Figura 23D). Essas proteínas poderiam ser produto de degradação da SUMO/LALP2 ou proteínas truncadas.

Para minimizar a produção de proteínas truncadas realizamos testes de expressão temperaturas mais baixas e por maior tempo de indução, mas não obtivemos alteração do padrão de expressão (dados não mostrados).

O resultado de solubilidade com a SUMO/LALP2 era muito promissor, uma vez que foi a primeira vez que obtivemos astacina recombinante solúvel em *E. coli*, sem a necessidade de redobramento “in vitro”. Portanto, optamos por realizar expressão em larga escala e tentar purificar a proteína de interesse, mesmo com esse resultado do “western blotting”.

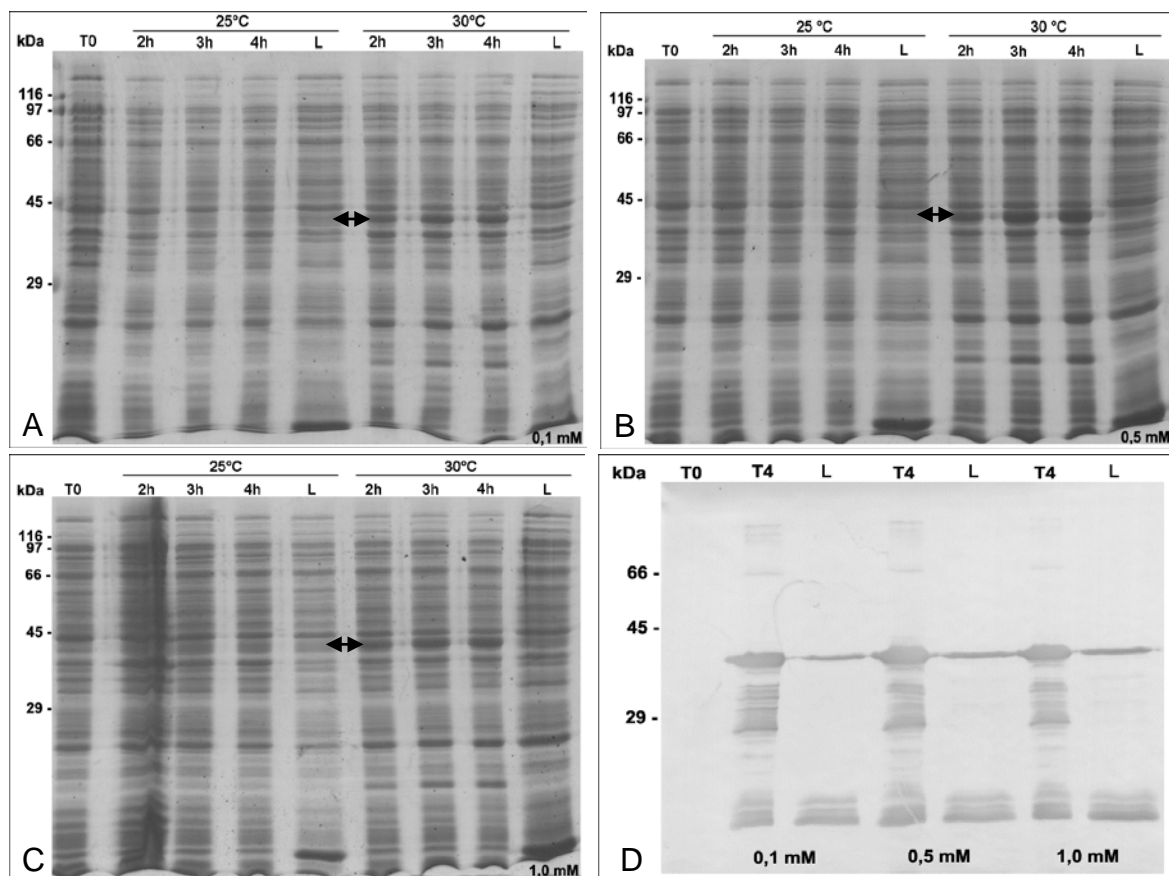


FIGURA 23: TESTES DE EXPRESSÃO E SOLUBILIDADE DA SUMO/LALP2. As figuras A, B e C são géis de poliacrilamida 12,5%. Em A estão as amostras das culturas induzidas com 0,1 mM de IPTG, em B as amostras das culturas induzidas com 0,5mM de IPTG e em C as amostras das culturas induzidas com 1,0mM de IPTG (concentrações indicadas na parte inferior dos géis). As temperaturas e os tempos de indução estão indicados na parte superior dos géis, sendo as temperaturas acima do traço (25°C e 30°C) e os tempos abaixo (T0, 2h, 3h e 4h). As frações solúveis estão indicadas como L (lisado). A figura D é o western blotting realizado com as amostras das culturas induzidas a 30°C utilizando anticorpo anti-6xHis (1:3000). À esquerda de cada figura estão os marcadores de massa molecular em kDa.

A expressão em larga escala foi realizada em duas culturas de 1L de meio LB, com 0,5 mM de IPTG por 3h a 30°C (Figura 24). Após a expressão, as bactérias das duas culturas foram recuperadas por centrifugação, ressuspendidas em tampão de ligação contendo 1mg/mL de lisozima e mantidas em -20°C por 16h. A lise foi completada por sonicação, as frações solúveis foram obtidas após centrifugação e as amostras foram preparadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. Os resultados mostram que a proteína de interesse foi expressa nas duas culturas realizadas e uma pequena parte é encontrada nas frações solúveis (Figura 24). Para a purificação, reunimos os lisados das duas culturas e incubamos com 300 µL de resina Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose por 1h a 4°C.



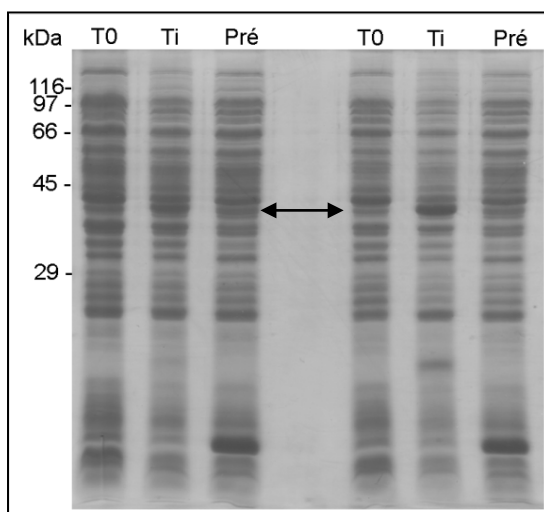


FIGURA 24: EXPRESSÃO DA SUMO/LALP2 EM LARGA ESCALA. O gel de poliácridamida 12,5% mostra a expressão de duas culturas de BL21(DE3)pLysS com 0,5mM de IPTG por 3h (Ti). As colunas Pré são as frações solúveis, amostras antes da incubação com a resina para purificação. À esquerda estão os marcadores de massa molecular em kDa.

Foram realizadas várias lavagens com tampão de lavagem (25 mM Imidazol) até a D.O.<sub>280</sub> atingir 0,001 e a eluição foi realizada com tampão contendo 250 mM de imidazol e foram coletadas 6 frações de 500 µL que foram monitoradas em espectrofotômetro em 280 nm (Gráfico 3). As frações 1, 2, 3 e 4 foram analisadas em gel de poliácridamida e os resultados mostram que a estratégia utilizada para purificação não foi suficiente para obtenção da proteína de interesse pura (Figura 25). Todas as frações apresentaram proteínas acima e abaixo da massa molecular esperada da SUMO/LALP2 (Figura 25).

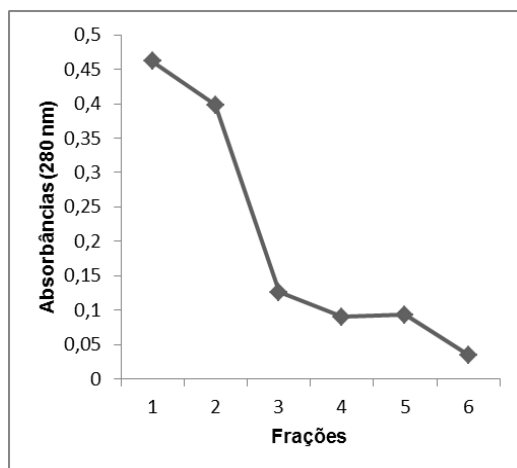


GRÁFICO 3: MONITORAMENTO DA PURIFICAÇÃO DA SUMO/LALP2 EM Ni<sup>2+</sup>-NTA AGAROSE. O gráfico mostra as absorbâncias em 280nm de cada fração obtida da eluição com 250 mM de imidazol. No eixo X estão as frações e no eixo Y estão as absorbâncias.

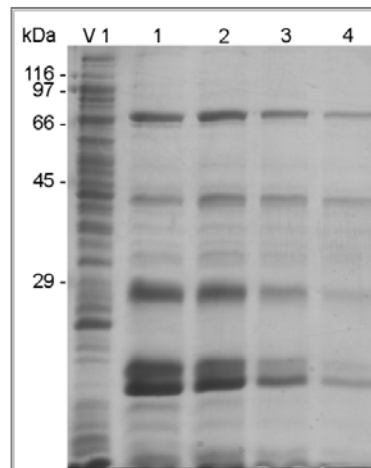


FIGURA 25: ANÁLISE EM SDS-PAGE DA PURIFICAÇÃO DA SUMO/LALP2 EM Ni<sup>2+</sup>-NTA AGAROSE. V1 – proteínas que não ligaram na resina (Void). 1 a 4 são amostras das frações eluídas da coluna. À esquerda estão os marcadores de massa molecular em kDa.

O resultado de “western blotting” da fração 1 e 3 com anti-6xHis mostra que as bandas abaixo de 45 kDa são referentes a expressão de proteínas recombinantes por possuírem a etiqueta de histidina e a ausência de reação positiva nas bandas acima indicam que essas são contaminantes de proteínas bacterianas. As bandas observadas abaixo da banda de interesse poderiam ser produto de atividade proteolítica e essa atividade poderia ser da LALP2 ao longo da expressão ou ser produto de expressão truncada (Figura 25). Ao se comparar as bandas positivas com anti-6xHis e com anti-LALP1, observa-se que a banda referente a SUMO/LALP2 e algumas bandas entre a banda de interesse e o marcador de 29kDa foram identificadas com os dois anticorpos (Figura 26). Na reação com anti-LALP1, houve o reconhecimento bastante intenso de uma banda em aproximadamente 28 kDa que não é observada com o anti-6xHis (Figura 26). Reforçando a possibilidade de atividade da LALP2 e sugerindo uma atividade autocatalítica.

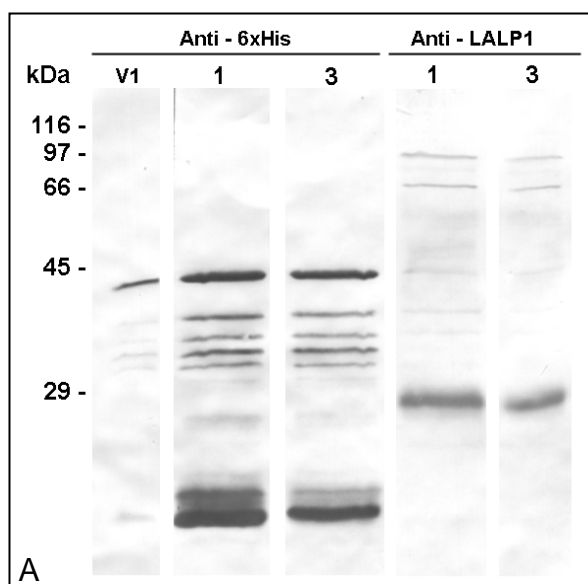


FIGURA 26: ANÁLISE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS POR “WESTERN BLOTTING”. V1 – proteínas que não ligaram na resina Ni-NTA agarose. 1 e 3 – reconhecimento das proteínas eluídas pelos anticorpos utilizados, anti-6xHis e anti-LALP1. À esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular em kDa.

Para avaliar se a LALP2 estava biologicamente ativa, o que justificaria as bandas abaixo de 45 kDa observadas após a tentativa de purificação, reunimos as 4 frações, dialisamos contra PBS 1x e avaliamos a atividade proteolítica frente à gelatina e fibrinogênio. Nos ensaios de zimograma não foi possível identificar atividade gelatinolítica até a concentração de 15 µg (Figura 27) e nos ensaios de degradação de fibrinogênio também não observamos atividade proteolítica mesmo utilizando proporção igual de enzima e de substrato (Figura 28).

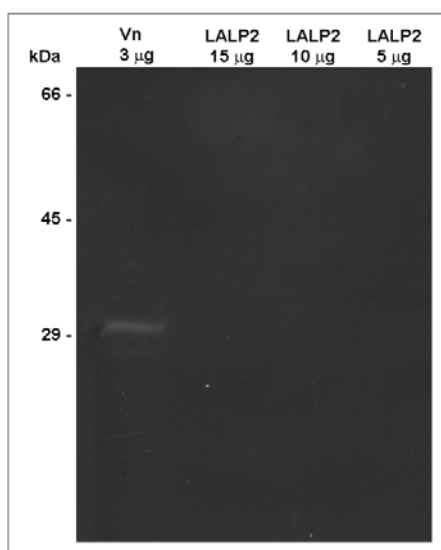


FIGURA 27: AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DA SUMO/LALP2. Na parte superior do zimograma de gelatina estão as amostras e quantidades de proteínas aplicadas. Vn –veneno de *L. intermedia* (controle positivo), LALP2 – amostras de SUMO/LALP2 após reunião das frações 1 a 4 da purificação em Ni-NTA agarose e diálise contra PBS1x.

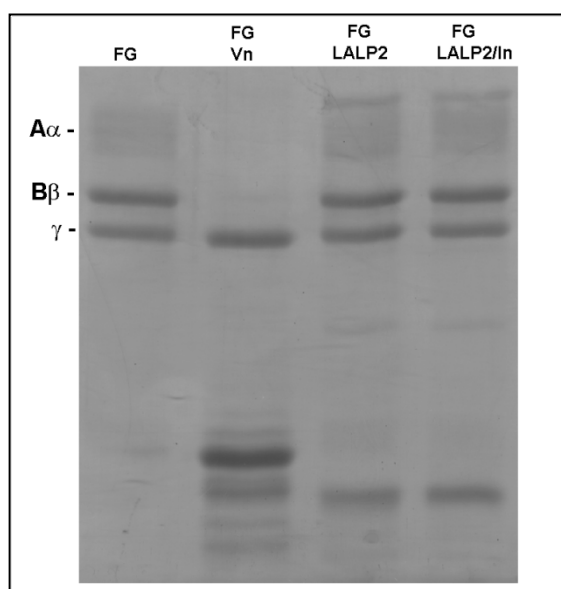


FIGURA 28: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA DA SUMO/LALP2. Amostras de fibrinogênio (FG) foram incubadas com LALP2 na proporção enzima:substrato de 1:2 (12,5 µg de SUMO/LALP2 para 12,5 µg de FG) por 16 h a 37 °C. As amostras foram preparadas com tampão em condições redutoras e submetidas à SDS-PAGE 10%. À esquerda estão representadas as cadeias que compõem a molécula de FG. FG –fibrinogênio controle, FG/Vn - FG incubado com veneno *L. intermedia* - controle positivo, (1:12,5), FG/LALP2 - FG incubado com SUMO/LALP2 e FG/LALP2/In - FG incubado com SUMO/LALP2 e 5 mM de 1-10 fenantrolina (inibidor).

A ausência de atividade proteolítica apresentada pela SUMO/LALP2 pode ser devido à proteína de fusão e a etiqueta de histidinas estarem na porção N-terminal da LALP2. Essa hipótese também pode ser válida para as construções em pET-14b, nas quais a etiqueta de histidina também está na porção N-terminal, e mesmo após atingirem solubilidade por redobrimento “in vitro”, não apresentaram atividade proteolítica. Para avaliar essa possibilidade, realizamos a predição da estrutura tridimensional da LALP2 e da LALP1 baseados na estrutura da astacina de *Astacus astacus*. Os resultados das predições da LALP1 (Figura 30) e LALP2 (Figura 31) mostram que região N-terminal apresenta um dobramento em direção ao domínio catalítico, com distância aproximada de 12,69 Å na LALP1 e 12,71 Å na LALP2. Já, a distância entre a extremidade C-terminal e o sítio catalítico é quase o dobro da

apresentada para N-terminal, sendo 24,15 Å na LALP1 e 23,77 Å para a LALP2. Portanto, a presença de etiqueta e proteínas de fusão na porção N-terminal da LALP1 e LALP2 pode estar atrapalhando a correta conformação do domínio catalítico e impedindo a interação com os substratos. Para confirmar essa hipótese, uma vez que, as estruturas apresentadas são somente predições, será necessário realizar ensaios de clivagem das etiquetas que estão na região N-terminal, ou ainda realizar construções em vetores com etiquetas na região C-terminal das LALPs, seguidos de novos testes de atividade.

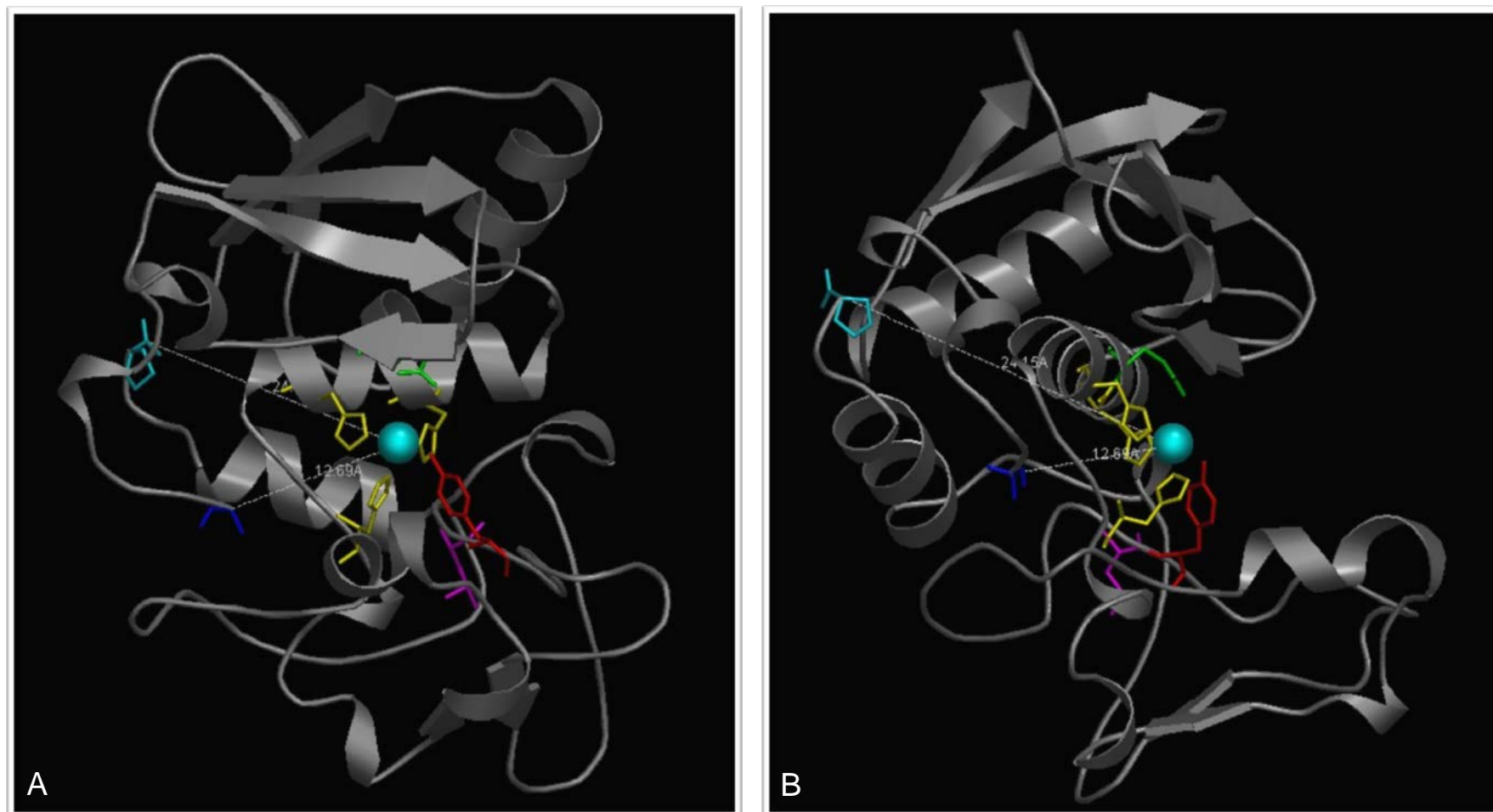


FIGURA 29: PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LALP1. As figuras (A) e (B) representam a predição da estrutura da LALP1, em (A) é a vista frontal evidenciando o domínio catalítico e em (B) vista lateral. Nas estruturas estão mostrados os resíduos de aminoácidos que participam da estabilização do íon zinco no sítio catalítico: em amarelo estão representadas as histidinas 92, 96, 102 e 148; em verde está representado o ácido glutâmico 93 e em vermelho a tirosina 149. A esfera azul representa o íon zinco. Em azul escuro está representado o segundo resíduo (Ala 2) da região N-terminal. Em azul claro está representado a prolina 198 representando a região C-terminal. Em (B) está destacada a distância de aproximadamente 12,69 Å entre a extremidade N-terminal e o íon zinco e a distância de aproximadamente 24,15 Å entre a extremidade C-terminal do domínio catalítico e o íon zinco. Análise realizada no programa Open Astex Viewer.

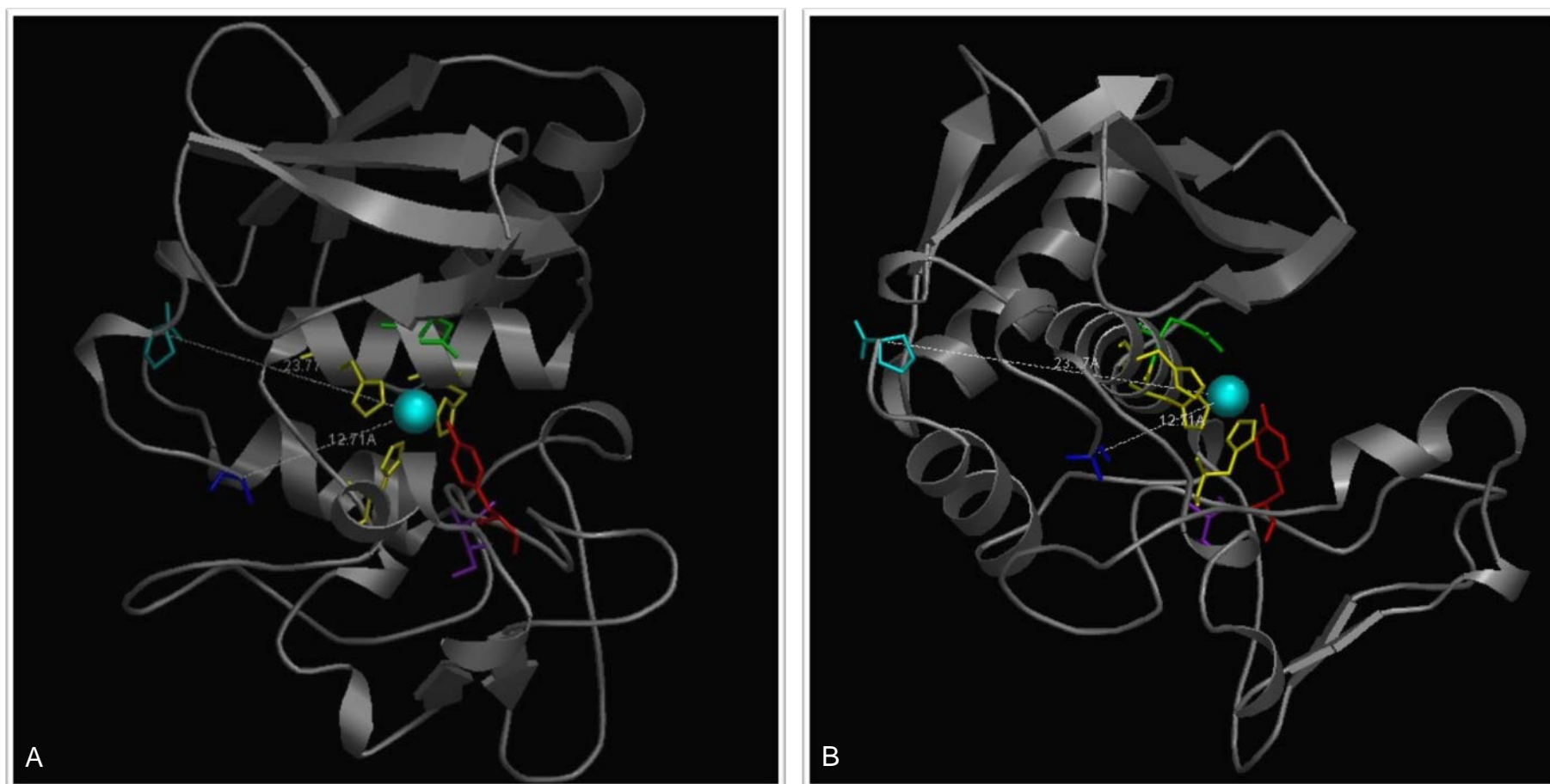


FIGURA 30: PREDIÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LALP2. As figuras (A) e (B) representam a predição da estrutura da LALP1, em (A) é a vista frontal evidenciando o domínio catalítico e em (B) vista lateral. Nas estruturas estão mostrados os resíduos de aminoácidos que participam da estabilização do íon zinco no sítio catalítico: em amarelo estão representadas as histidinas 92, 96, 102 e 148; em verde está representado o ácido glutâmico 93 e em vermelho a tirosina 149. A esfera azul representa o íon zinco. Em azul escuro está representado o segundo resíduo (Ala 2) da região N-terminal. Em azul claro está representado a prolina 198 representando a região C-terminal. Em (B) está destacada a distância de aproximadamente 12,71 Å entre a extremidade N-terminal e o íon zinco e a distância de aproximadamente 23,77 Å entre a extremidade C-terminal do domínio catalítico. Análise realizada no programa Open Astex Viewer.

### 3.5 DISCUSSÃO

Estudos de proteases da família das astacinas são realizados através de purificação das astacinas nativas dos organismos em estudo ou por produção de astacinas recombinantes (Gomis-Ruth *et al.*, 1993a; Reyda *et al.*, 1999). Devido à problemática na obtenção do veneno de aranha-marrom em quantidades que possibilitem a purificação das astacinas nativas para utilização em ensaios bioquímicos e biológicos, optamos pela produção das astacinas loxoscélicas de forma recombinante. Muitos trabalhos que objetivam avaliar características estruturais, atividade bioquímica e biológica de diferentes astacinas, utilizam a tecnologia do DNA recombinante para obtenção das enzimas em estudo (Reyda *et al.*, 1999; Yiallourous *et al.*, 2000; Yokozawa *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2006; Borchert *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2008; Becker-Pauly *et al.*, 2009; Jing *et al.*, 2010).

A bactéria *E. coli* foi o primeiro sistema utilizado para expressão de proteínas recombinantes e, atualmente, continua sendo o sistema de expressão heteróloga mais utilizado (Sahdev *et al.*, 2008). Isso porque, os métodos utilizados para expressão em *E. coli* são simples e rápidos devido ao tempo de duplicação das células ser pequeno, as fontes de carbono para crescimento não são caras e as células são viáveis quando cultivadas em alta densidade, possibilitando a produção em larga escala (Sahdev *et al.*, 2008; Brondyk, 2009).

As cepas de *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes precisam apresentar algumas características, como deficiência na produção da maioria das proteases naturais e manutenção da estabilidade dos plasmídeos de expressão (Sorensen e Mortensen, 2005). A cepa BL21(DE3) pLysS é uma das cepas mais comuns de *E. coli* e foi utilizada para expressão das astacinas loxoscélicas por ter sido eficiente para produção de diferentes isoformas de fosfolipases-D (Chaim *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2007b; Appel *et al.*, 2008; Kusma *et al.*, 2008) e TCTP (Sade *et al.*, 2012), ambas toxinas de veneno de *L. intermedia*.

A cepa Rosetta-gami foi utilizada no presente trabalho porque possui duas vantagens em relação à cepa anterior, possui RNAt para códons raros de *E. coli* e apresenta deficiência em proteínas redutoras, tornando o ambiente citoplasmático menos redutor, o que favorece a formação de pontes dissulfeto. Essa última característica é compartilhada pela outra cepa utilizada, AD494, por ser deficiente

em tioredoxina *trxB*. A cepa SHuffle T7 Express Lys Y, também possui a característica de citoplasma menos redutor, por ser deficiente em glutaredoxina e tioredoxina, e possui uma enzima ponte dissulfeto isomerase que atua como uma chaperona no citoplasma, auxiliando no dobramento correto das proteínas recombinantes. Muitos trabalhos postulam a utilização das mais variadas cepas como alternativa para melhorar a obtenção de proteínas recombinantes na fração solúvel (Sorensen e Mortensen, 2005; Peti e Page, 2007; Sahdev *et al.*, 2008). Porém, em todas as cepas utilizadas obtivemos expressão da LALP1 e LALP2 em corpos de inclusão quando utilizado o vetor pET-14b nas condições testadas. É descrito um aumento na solubilidade de proteínas recombinantes quando essas são expressas em temperaturas mais baixas, porque as interações hidrofóbicas para formação de corpos de inclusão são dependentes de temperatura, o que baixas temperaturas, aumenta a estabilidade e a obtenção de padrões corretos de dobramento protéico (Sahdev *et al.*, 2008). Portanto, realizamos expressões das astacinas em temperaturas de 25°C, 20°C e 16°C, entretanto as proteínas ainda formaram corpos de inclusão.

Os dados da literatura mostram que somente 10% das proteínas eucarióticas que já foram expressas em *E. coli* foram produzidas na forma solúvel (Burgess, 2009), mostrando que a obtenção de proteínas recombinantes na forma solúvel e ativa é realmente uma tarefa árdua. Encontrar as condições ideais para produção heteróloga de astacinas funcionais é ainda mais desafiador. Os estudos que utilizaram expressão de astacinas em *E. coli*, só chegaram a obtenção da conformação nativa após realização de redobramento *in vitro* (Reyda *et al.*, 1999; Yiallourous *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2006; Da Silveira *et al.*, 2007c). Até mesmo no estudo que expressou somente a região do domínio catalítico de uma astacina de ostra, foi necessária a etapa de redobramento “*in vitro*” para atingir solubilidade e atividade da enzima (Xiong *et al.*, 2006).

Existem descritos diferentes métodos de redobramento “*in vitro*”, mas o problema central de todos é que no momento de reduzir os agentes desnaturantes e/ou redutores utilizados para solubilizar os corpos de inclusão ocorre uma grande precipitação das proteínas de interesse, o que leva a um baixo rendimento do processo (Burgess, 2009). O tampão ideal para que uma dada proteína atinja o



dobramento nativo e biologicamente ativo é extremamente variável e dependente das características da proteína em estudo (Tsumoto *et al.*, 2003). Em geral, os tampões utilizados para ensaios de redobramento “in vitro” contêm pares oxidantes/redutores, aminoácidos (arginina ou prolina), glicerol ou açúcares (sucrose, sorbitol ou manitol) e diferentes aditivos como polietilenoglicol e ciclodextrina. Algumas diretrizes podem ser seguidas levando-se em consideração os trabalhos que utilizam técnicas de redobramento para proteínas semelhantes, da mesma família ou com as mesmas características (Tsumoto *et al.*, 2003; Burgess, 2009).

Os métodos de redobramento in vitro utilizados no presente trabalho foram eficientes para obtenção da LALP1 solúvel e em quantidade que possibilitaria realização de ensaios “in vivo”, mas os ensaios “in vitro” mostraram que ela não estava biologicamente ativa. Mesmo realizando os mesmos métodos de redobramento in vitro utilizados para astacinas de lagostim *Asctacus astacus* (Reyda *et al.*, 1999) e de ostra *Pinctata fucata* (Xiong *et al.*, 2006), não foi possível obter a LALP1 com atividade proteolítica.

Uma alternativa viável, e que tem sido utilizada para proteínas recombinantes de difícil obtenção, é a utilização de proteínas de fusão para melhorar a solubilidade e possibilitar purificação (Sorensen e Mortensen, 2005). Utilizamos o plasmídeo pET-SUMO para expressar a LALP2 fusionada à proteína SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*). Proteínas da família ubiquitina têm sido utilizadas como proteínas de fusão e promovem aumento na solubilidade, estabilidade e no rendimento das proteínas ou peptídeos recombinantes (Satakarni e Curtis, 2011). Os testes realizados com pET-SUMO foram promissores, uma vez que SUMO/LALP2 foi expressa e estava presente na fração solúvel, ainda que em pouca quantidade. As análises eletroforéticas da fração solúvel mostraram que a existência de bandas em diferentes alturas e positivas nas reações de *western blotting* com anti-6xHis não eram resultado da atividade proteolítica da SUMO/LALP2, pois essa não apresentou atividade proteolítica. A possibilidade dessas bandas serem formas truncadas corrobora com a comparação com o perfil de expressão somente do SUMO. Portanto, mais testes serão necessários para minimizar a formação das formas truncadas e também para viabilizar a obtenção da SUMO/LALP2 com atividade.

Um estudo recente, relata a utilização desse mesmo vetor (pET-SUMO) para expressão de peptídeo (PnTx3-4) de aranha armadeira *Phoneutria nigriventer*. Os autores, além de utilizar a SUMO como fusão, realizaram co-expressão de duas chaperonas em células de *E. coli* cepa Origami e mostraram que a proteína SUMO/PnTx3-4 foi expressa tanto na fração solúvel quanto em corpos de inclusão (Souza *et al.*, 2012). Para os ensaios de atividade do peptídeo recombinante, os autores clivaram a SUMO do peptídeo de interesse com SUMO protease e purificaram tanto a fração solúvel quanto a insolúvel, separadamente. Os resultados mostraram que o peptídeo obtido da fração solúvel apresentou atividade biológica e o peptídeo da fração insolúvel só apresentou atividade após redobramento *in vitro* por diluição rápida (Souza *et al.*, 2012). As estratégias utilizadas nesse estudo aparecem como ótimas possibilidades para futuras tentativas com as astacinas loxoscélicas, principalmente a co-expressão com chaperonas e clivagem da SUMO para melhorar a purificação e obtenção das astacinas ativas. A co-expressão com chaperonas poderia melhorar a razão proteína solúvel/corpos de inclusão e um melhor rendimento na purificação pode ser atingido por ter maior quantidade da proteína de interesse na fração solúvel. A utilização da SUMO protease após ligação das proteínas na resina de Ni<sup>2+</sup>-NTA, eluiria somente a LALP2, sendo que as formas truncadas de 6xHis/SUMO e a proteína de fusão ligada à LALP2, ficariam ligadas à resina. Ainda, a retirada da SUMO da porção N-terminal da astacina recombinante possibilitaria maior aproximação dos resíduos do início da proteína madura à região do sítio catalítico, o que poderá auxiliar na obtenção da conformação correta e consequente ativação da astacina.

Vale ressaltar que além dos dados mostrados no presente trabalho sugerirem que etiquetas colocadas na porção N-terminal das astacinas podem dificultar a obtenção da conformação ativa, todos os artigos que produziram diferentes astacinas recombinantes utilizaram etiqueta na porção C-terminal das proteínas, ou simplesmente não utilizaram nenhum tipo de etiqueta, nem para melhorar solubilidade, nem para facilitar a purificação (Reyda *et al.*, 1999; Yiallourous *et al.*, 2000; Yokozawa *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2006; Borchert *et al.*, 2007; Sweeney *et al.*, 2008; Becker-Pauly *et al.*, 2009; Jing *et al.*, 2010). Portanto, outra possibilidade para obtenção das astacinas loxoscélicas recombinantes solúveis e ativas em *E. coli*

é a utilização de etiquetas ou de proteínas de fusão na porção C-terminal dessas proteases.

A busca de estudos de diferentes membros da família das astacinas produzidos de forma recombinante mostrou que somente um estudo utilizou a estratégia de proteína de fusão para produção da astacina recombinante (Borchert *et al.*, 2007). Nesse trabalho, foi avaliada a atividade da astacina denominada Onchoastacina presente no nematódeo *Onchocerca volvulus*. A onchoastacina foi fusionada a proteína ligadora de maltose (MBP) e a expressão foi realizada em células de *E. coli*. A expressão da onchoastacina/MBP recombinante foi obtida na forma solúvel, mas após a purificação e retirada da proteína de fusão, não foi observada atividade da onchoastacina. A estratégia alternativa descrita pelos autores para obtenção da onchoastacina ativa foi a produção dessa enzima em células de inseto, utilizando sistema de baculovírus (Borchert *et al.*, 2007). Outros artigos mostram que a expressão de astacinas recombinantes não está restrita a células de *E. coli* (sistema procarióticos), mas também sistemas eucarióticos como expressão em células de inseto (sistema baculovírus ou outros vetores) (Yokozawa *et al.*, 2002; Borchert *et al.*, 2007) e células de mamíferos (Decrem *et al.*, 2008). A utilização de sistemas eucarióticos também se apresenta como uma ótima alternativa para a produção das astacinas loxoscélicas, as células eucarióticas possuem toda a maquinaria (retículo endoplasmático e complexo de Golgi) para realizar as modificações co-traducionais e pós-traducionais, como formação de pontes dissulfeto e glicosilação (Rai e Padh, 2001; Yin *et al.*, 2007).

Em estudo anterior, foi descrita a expressão da LALP1 recombinante de forma solúvel em células de levedura *Pichia pastoris*, mas ocorreu hiperglicosilação da proteína recombinante (Da Silveira, 2006). Após avaliação da atividade da LALP1 produzida em levedura, foi constatada a ausência de atividade proteolítica, possivelmente devido à hiperglicosilação, ou ainda, devido a LALP1 ter sido expressa na forma de proenzima (Da Silveira, 2006).

Portanto, o modelo mais promissor para expressão das astacinas loxoscélicas no início do desenvolvimento do presente trabalho era bactéria *E. coli*, na qual a LALP1 havia sido obtida com atividade após redobramento “in vitro” por diálise, mas não em quantidade suficiente que possibilitassem estudos “in vivo” (Da Silveira *et al.*,

2007c). Os resultados obtidos no presente trabalho e os dados da literatura, norteiam a obtenção de astacinas recombinantes para avaliação de suas funcionalidades biológicas para novos ensaios, como: clivagem da SUMO N-terminal, construção de novos vetores recombinantes com etiquetas de solubilidade na porção C-terminal ou expressão das enzimas maduras em modelos eucarióticos.

## CAPÍTULO 2

---

**Subproteoma de metaloproteases do tipo astacina presentes no veneno de  
três espécies de *Loxosceles* (aranhas-marrons)**

## 4.1 INTRODUÇÃO

Muitas identificações e descrições de diferentes proteínas que compõem os venenos loxoscélicos foram realizadas por meio de identificação das atividades observadas na mistura proteica dos venenos. Com essa abordagem foram descritas várias atividades, como esfingomielinásica, metaloproteásica, serinoproteásica e hialuronidásica (Feitosa *et al.*, 1998; Merchant *et al.*, 1998; Veiga *et al.*, 2000a; Da Silveira *et al.*, 2002; Da Silveira *et al.*, 2007a). As esfingomielinases-D, mais recentemente caracterizadas como fosfolipases-D, foram identificadas em venenos loxoscélicos no final da década de 80 e os primeiros estudos de análise de sequências foram realizados por sequenciamento amino-terminal a partir de purificação das isoformas nativas de veneno de *L. intermedia*, por meio de técnicas cromatográficas (Tambourgi *et al.*, 1998).

O primeiro relato de utilização de espectrometria de massas para identificação de proteínas em aranhas do gênero *Loxosceles* foi em 2003 com objetivo de identificar quais grupos filogenéticos de aranhas possuíam esfingomielinases-D (Binford e Wells, 2003). Nesse estudo, foram analisados venenos de diferentes aranhas, dentre elas 10 espécies de *Loxosceles*, incluindo *L. laeta* e outras 9 espécies da África e América do Norte. As análises de espectrometria de massas mostraram que, em todas as espécies de *Loxosceles* e de *Sicarius* (táxon irmão do gênero *Loxosceles*), existem pelo menos 4 a 6 moléculas entre 31-35 kDa, que corresponde à região das esfingomielinases até então descritas (Binford e Wells, 2003). Em 2005, com intuito de avaliar o conteúdo de esfingomielinases-D do veneno de *L. gaucho*, foi realizada análise proteômica do veneno dessa espécie com géis bidimensionais, sequenciamento de novo por espectrometria de massas combinado com sequenciamento amino terminal (Machado *et al.*, 2005). Com essa estratégia experimental, foram identificadas pelo menos 11 isoformas de esfingomielinases-D. Em 2009, uma análise proteômica mais ampla realizada com veneno de *L. intermedia*, utilizando a técnica MudPiT (*Multidimensional protein identification technology*), identificou 39 proteínas, dessas, 14 foram agrupadas como toxinas geralmente encontradas em venenos animais e consideradas como responsáveis pelos danos teciduais em quadros de envenenamento loxoscélico.

Dentre as toxinas identificadas, somente 2 eram metaloproteases dependentes de zinco para atividade catalítica (Dos Santos *et al.*, 2009).

Os avanços em biologia molecular, os estudos de transcriptomas e a produção de toxinas recombinantes revolucionaram o estudo dos venenos loxoscélicos, sendo identificadas, comparadas e caracterizadas famílias de toxinas, como exemplo, a família LoxTox do veneno de *L. intermedia* com inúmeras isoformas de fosfolipases-D (Kalapothakis *et al.*, 2007) e a família das astacinas loxoscélicas, atualmente com 5 isoformas de metaloproteases do tipo astacinas descritas (Da Silveira *et al.*, 2007c; Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

Como já mencionado em diferentes momentos nessa tese, o estudo das astacinas de venenos loxoscélicos é recente e ao se compilar dados dos dois estudos de transcriptoma de glândulas de veneno de *L. intermedia* (Gremski *et al.*, 2010) e de *L. laeta* (Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008) e os dados de atividade biológica (Feitosa *et al.*, 1998; Da Silveira *et al.*, 2002; Da Silveira *et al.*, 2007c), sugere-se que os venenos loxoscélicos sejam compostos por uma grande quantidade de isoformas de astacinas e que essas enzimas desempenham funções importantes para a biologia das aranhas-marrons, além de apresentar grande participação nos eventos tóxicos do loxoscelismo, como espalhamento das demais toxinas pelo tecido e distúrbios hemostáticos decorrentes da picada de aranhas-marrons. Porém, essas hipóteses ainda precisam ser melhor estudadas, isso porque, os dados dos transcriptomas e de clonagem molecular se baseiam em sequências de mRNAs e, portanto; são informações apenas dos transcritos das glândulas de venenos os quais podem sofrer diferentes processamentos e até mesmo serem degradados antes de serem traduzidos.

O presente capítulo mostra a análise de subproteoma de astacinas em venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, bem como análises de espectrometria de massas de astacinas nativas do veneno de *L. intermedia*.

## 4.2 OBJETIVOS

### 4.2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o subproteoma de astacinas, metaloproteases dependentes de zinco, presentes no veneno de espécies de aranhas-marrons de importância médica no Brasil (*L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*).

### 4.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar perfil proteico dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* em géis bidimensionais;
- Analisar o conteúdo de astacinas nativas nos venenos das três espécies em estudo por meio de imunodeteção bidimensional (“western blotting”);
- Avaliar atividade gelatinolítica das astacinas nativas;
- Avaliar a glicosilação das astacinas nativas de *L. intermedia*;
- Identificar as astacinas presentes no veneno de *L. intermedia* por espectrometria de massas.



### 4.3 MATERIAIS e MÉTODOS

#### 4.3.1 REAGENTES

Os sais, ácidos, bases, solventes orgânicos e a fenantrolina foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os marcadores de massa molecular para SDS-PAGE, o BSA, o Ponceau-S e os anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunodeteção (“western blotting”) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MI, EUA). O BCIP, o NBT e a Tripsina foram adquiridos da Promega (Madison, WI, EUA). Os reagentes dodecil sulfato de sódio, corante Azul de Coomassie, Tris, Glicina, Uréia, Thio-Uréia, Persulfato de Amônio, foram adquiridos da GE (Grand Island, NY, EUA).

#### 4.3.2 OBTENÇÃO DOS VENENOS LOXOSCÉLICOS

O veneno de *L. intermedia* foi obtido de aranhas adultas coletadas na cidade da Lapa (Certificado IBAMA). Após a captura, as aranhas foram mantidas em laboratório com troca de água semanal e alimentação mensal. Após duas semanas sem alimentação, as aranhas foram submetidas à eletrochoque de 15V no cefalotórax (Feitosa *et al.*, 1998), a gotícula cristalina de veneno foi coletada das quelíceras com micropipeta, solubilizada em PBS (NaCl 100mM; Tampão Fosfato de Sódio 10mM; pH 7,3) e mantida em gelo até o final da coleta. Os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* foram gentilmente cedidos pelo CPPI, Prof. Dr. João Carlos Minoso e Msc. Isolete de Pauli. Os venenos das três espécies foram dosados através do método de Bradford (Bradford, 1976), diluídos com PBS para concentração final de 2 mg/mL, aliquotados em 50 µL e armazenados em “freezer” a -20°C.

#### 4.3.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação das proteínas foi realizada baseada no método do Azul de Coomassie, descrito por BRADFORD (1976), como descrito no capítulo 1 item 3.3.3 do materiais e métodos.

#### 4.3.4 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

Primeiramente, amostras de venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* foram submetidas aos procedimentos do *kit 2-D clean up* (GE Healthcare), para retirada de sais e nucleotídeos que interferem na focalização isoeletrica das

proteínas. Após o *clean up*, os venenos foram solubilizados em tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 0,5% Tampão IPG pH 6-11 ou pH 3-10, 0,002% Azul de Bromofenol e 100 mM DTT) (Rasmussen *et al*, 1992) e dosados com *kit 2-D Quant Kit* (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. Amostras de 100 µg de cada veneno, diluídas em 250 µL de tampão de reidratação, foram utilizadas para reidratar as fitas de géis com anfólitos imobilizados (*DryStrip*). A reidratação das fitas (pH 3-10 ou pH 6-11) foi realizada de forma passiva à temperatura ambiente por 16 h em suporte apropriado (*IPG-Box®*, GE Healthcare). Imediatamente após o término da reidratação, as fitas foram submersas em óleo mineral, suas extremidades foram protegidas com papéis filtro umedecidos com 200 µL de água MiliQ e os eletrodos foram posicionados acima dos papéis protetores e fixados. A focalização isoeletrica foi realizada a 20°C, em total de 5 h em equipamento IPGphor® (GE Healthcare) programado com os seguintes passos: 500V por 1h; 1000 V por 1 h e 8000 V por 4 h a 75 mA/fita. Ao término da focalização, as fitas foram retiradas do equipamento e armazenadas a -20°C por 16 h. Os géis desnaturantes de poli(acrilamida) 12,5% foram preparados e polimerizados à temperatura ambiente por 16 h.

Para a corrida da segunda dimensão, as fitas foram descongeladas e incubadas em tampão de equilíbrio (6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS) contendo 125 mM DTT para redução das pontes dissulfeto, por 15 min, sob agitação, à temperatura ambiente. Após a redução, o tampão foi trocado por tampão de equilíbrio contendo 125 mM Iodacetamida (IAA) para alquilação das cisteínas, por 15 min, sob agitação, à temperatura ambiente protegido da luz. A corrida eletroforética foi realizada em corrente constante de 45 mA a 15°C. Ao final da corrida, os géis foram corados com Coomassie coloidal ou transferidos para nitrocelulose. Para a coloração, os géis foram mantidos sob agitação em todos os passos que incluíram: incubação em solução de fixação (ácido orto-fosfórico 1,3% e metanol 20%) por 1h, incubação em solução corante (Coomassie G-250 2,5% em ácido orto-fosfórico 2% e sulfato de amônio 10%) por 16 a 48 h, incubação em solução de neutralização (Tris 0,1 M pH 6,5; ajustado com ácido orto-fosfórico) por 3 minutos, lavagem em metanol 20% por 30 segundos, seguido de incubação em solução estabilizante (sulfato de amônio 0,2%) por 1 h e incubação em solução de armazenamento (ácido acético 1%). Os géis foram digitalizados no *Image Scanner III* (GE Healthcare) e analisados.

#### 4.3.5 SUBPROTEOMA DE ASTACINAS DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*

##### 4.3.5.1 “Immunoblotting” bidimensional

Após focalização e corrida eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 16 h, com voltagem constante (25 V) a 4°C. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado em pó diluído em PBS 3% (p/v) por 1h e incubadas com soro hiperimune anti-LALP1 (diluído na mesma solução de bloqueio) ou com soro pré-imune (controle negativo), por 2 h à temperatura ambiente e sob constante agitação. As membranas foram lavadas com o mesmo tampão, na ausência de anticorpo, e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) por 1 h à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para atividade de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM).

##### 4.3.5.2 Zimograma bidimensional

O preparo das amostras de veneno para os ensaios de zimograma com gelatina foi realizado da mesma maneira descrita no item 3.3.2; porém, na ausência de agente redutor DTT no tampão de reidratação, e os passos de redução e alquilação não foram realizados. As fitas, após focalização, foram equilibradas em tampão de equilíbrio por 15 min à temperatura ambiente e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 3 mg/ml de gelatina (Sigma). Após corrida eletroforética, os géis foram lavados 3 vezes de 25 min em Triton X-100 2,5%, e incubados à 37°C em tampão ótimo para atividade enzimática (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ZnSO<sub>4</sub>). Os géis foram corados com Azul de Coomassie e descorados com trocas sucessivas de metanol 50% (v/v). As bandas claras, lisadas do substrato, contra um fundo de coloração azul, indicaram a presença da degradação enzimática (proteases).

#### 4.3.6 “IMMUNOBLOTTING” COM LECTINAS

Após focalização e corrida eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 16 h, com voltagem constante 25 V, a 4°C. Para analisar a presença de glicosilação do tipo alta manose nas toxinas loxoscélicas foi *utilizado o kit DIG Glycan Differentiation* (Roche). As membranas foram bloqueadas com 3% de leite desnatado em pó e 0,05% Tween-20 diluído em TBS (Tris 50mM pH= 7,5 e 0,15 M NaCl) por 1h à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas 2 vezes de 10 minutos em TBS e 1 vez em TBS contendo  $MnCl_2$  1 mM,  $MgCl_2$  1 mM e  $CaCl_2$  1 mM e incubadas com lectina GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) modificada com digoxigenina, solubilizada nesse mesmo tampão, por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com TBS por 10 minutos e as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpos policlonais anti-digoxigenina conjugados com fosfatase alcalina solubilizados em TBS. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS e 1 lavagem com tampão ótimo para atividade da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e  $MgCl$  5 mM), a reação foi revelada com o substrato BCIP e o cromógeno NBT em tampão ótimo.

#### 4.3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os spots de interesse dos géis bidimensionais foram retirados, numerados e colocados em microtubos para serem descorados. Isso porque, o Coomassie liga-se aos resíduos de aminoácidos básicos presentes nas proteínas, e a presença do corante interferiria na etapa de digestão com enzima tripsina, a qual cliva resíduos internos de lisina e arginina, que também são básicos. Os spots foram descorados em solução contendo acetonitrila 50% e 25 mM de bicarbonato de amônio. Essa solução foi trocada várias vezes até que os spots estivessem totalmente descorados, transparentes.

Os spots descorados foram desidratados com 100  $\mu$ L de acetonitrila 100% e secos em concentrador rotatório (*Speed Vac*) por 20 min. Em seguida, os géis foram reidratados com 200  $\mu$ L de tampão  $NH_4HCO_3$  40mM e acetonitrila 25%. Para a digestão em gel foi utilizado 10 ng/ $\mu$ L de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin* - Promega) e realizada por 16 h a 37°C. Os fragmentos da digestão triptica foram extraídos com tampão de extração (5% ácido trifluoroacético e 50%

acetonitrila) por 3 extrações de 30 µL e os peptídeos foram recuperados em microtubos novos. As amostras foram desidratadas em *Speed-Vac* por 2 h e os peptídeos foram ressuspensos em 2 µL de ácido trifluoroacético 0,1%.

Para a análise em espectrômetro de massas *Ultraflex* MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltronics, GmbH), os peptídeos tripticos foram misturados com tampão 0,1% TFA e ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxicinâmico, contendo a matriz para espectrometria de massas na proporção 1:2, e aplicados em placa para MALDI (*Scout MTP MALDI Ion source 384 target* - Bruker Daltonics, GmbH). Os valores de massa triptica obtidos pela análise espectrométrica foram utilizados para identificação das proteínas por *peptide mass fingerprint* (PMF) utilizando o MASCOT (*Matrix Science*, UK) e banco de dados SWISS-PROT e NCBI (não redundante). Foi utilizada também a identificação das astacinas com o programa *Protein Prospector* (UCSF - Universidade da Califórnia, São Francisco) para buscas em banco de dados específico de sequências de proteínas do gênero *Loxosceles*. O banco de dados foi criado pelo pesquisador Dr. Paulo da Costa Carvalho (Instituto Carlos Chagas, Curitiba, PR). Para tanto, foram compiladas todas as sequências de *Loxosceles* do Uniprot e sequências do transcriptoma de *L. intermedia*, excluindo sequências exatamente iguais (no banco tem somente uma sequência representante de cada proteína), 100 sequências de contaminantes mais comuns e, por fim, para cada sequência foram geradas duas sequências artificiais (*decoys*). Nas buscas foram consideradas modificações como carbamidometilação de cisteínas, devido à alquilação de cisteínas com IAA e oxidação de metioninas. Além dessas modificações, foi considerada uma perda de clivagem por peptídeo, com tolerância de massa de 100 a 200 ppm (Macht *et al.*, 2004).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 PERFIL 2-D DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. laeta* E *L. gaucho*

Amostras de 100 µg de veneno das diferentes espécies em estudo foram preparadas, dosadas e submetidas à eletroforese bidimensional para comparação dos perfis proteicos. Os perfis proteicos dos três venenos são bastante semelhantes, sendo observada uma prevalência de proteínas de mobilidade eletroforética aparente entre 30-35 kDa, as quais possuem pI variando entre 5 a 10 (Figura 31). Todos os venenos estudados possuem proteínas entre 14-30 kDa e muito poucas de alta massa eletroforética aparente 35-97 kDa (Figura 31). Como esse perfil proteico está restrito a proteínas com pI entre 3-10 e massa eletroforética aparente entre 14-200 kDa é possível que esses venenos apresentem mais proteínas do que as observadas nesses experimentos. Porém, esse intervalo de massa e pI foram escolhidos porque o objetivo foi a identificação das metaloproteases do tipo astacinas e a literatura científica descreve atividade metaloproteolítica nesses venenos entre 20-35 kDa (Feitosa *et al.*, 1998; Da Silveira *et al.*, 2002; Barbaro *et al.*, 2005; Trevisan-Silva *et al.*, 2010).

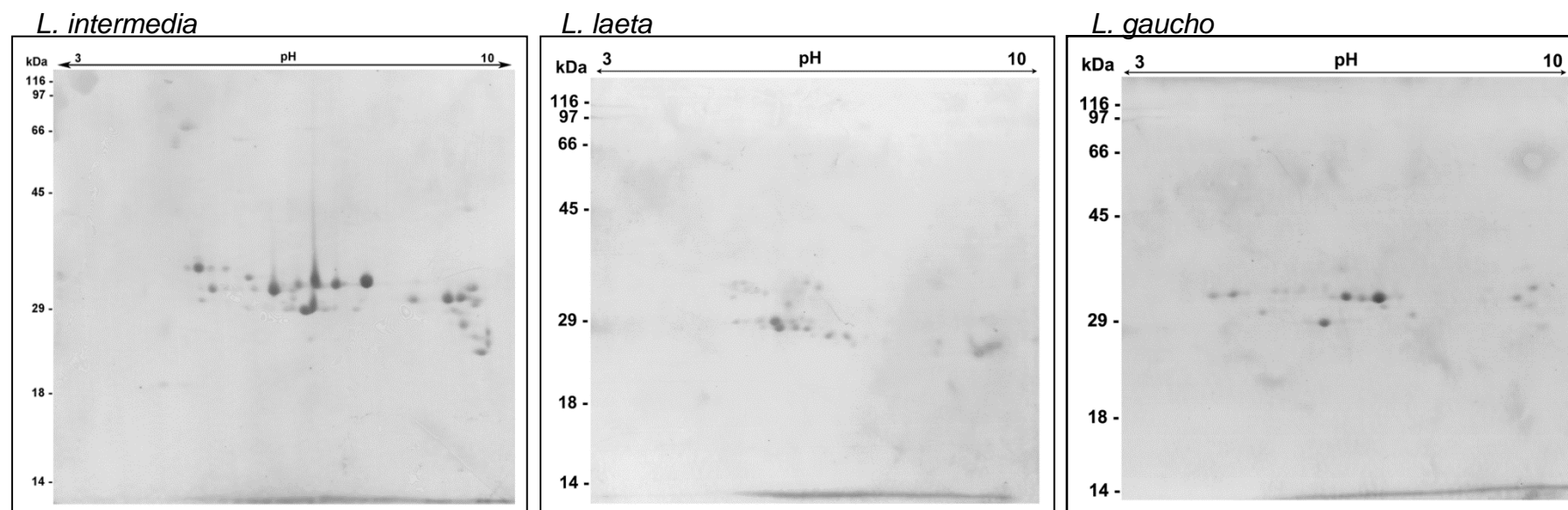


FIGURA 31: PERFIL PROTEICO BIDIMENSIONAL DOS VENENOS de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Os géis mostram o perfil proteico bidimensional dos três venenos em estudo com amostras de 100  $\mu$ g de proteínas totais. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular (kDa).

#### 4.3.2 ANÁLISE DO SUBPROTEOMA DE ASTACINAS DOS VENENOS DE *L. intermdia*, *L. laeta* E *L. gaucho*: IMUNOENSAIOS E ZIMOGRAMAS

Com intuito de identificar os *spots* referentes às metaloproteases do tipo astacinas, realizamos subproteoma de astacinas por meio de ensaios de immunoblotting utilizando soro hiperimune de coelhos que reconhecem LALP1 (*Loxosceles* astacin-like protease 1 recombinante) desnaturada (Trevisan-Silva *et al.*, 2010). Ensaios de zimograma para avaliar a atividade gelatinolítica dos *spots* dos venenos em estudo também foram realizados. Nos imunoensaios com anticorpos anti-LALP1, utilizando os perfis eletroforéticos bidimensionais imobilizados em nitrocelulose, obtivemos reações positivas nos três venenos, sendo identificados 7 *spots* no veneno de *L. intermdia* e de *L. laeta* e 5 *spots* no veneno de *L. gaucho* (Figura 32). A maioria dos *spots* que foram reconhecidos pelos anticorpos policlonais anti-LALP1 tem pl básico ou neutro (7 *spots* de *L. intermdia*, 5 de *L. laeta* e *L. gaucho*) e somente 2 *spots* de *L. laeta* tem pl mais ácido (aproximadamente 6,0). Com intuito de reforçar esses dados, realizamos ensaios de atividade gelatinolítica com zimogramas, que possibilitam a comparação entre os *spots* reconhecidos pelos anticorpos anti-LALP1 e os *spots* com atividade proteolítica típica de astacinas loxoscélicas. Os resultados obtidos foram impressionantes, para *L. intermdia* nós obtivemos 7 *spots* com atividade gelatinolítica, para *L. laeta* 24 *spots* e para *L. gaucho* 10 *spots* (Figura 33). É importante salientar que para os três venenos analisados não foi possível obter uma relação direta entre os *spots* com reação positiva com anticorpos anti-LALP1 e os *spots* que apresentaram atividade proteolítica frente à gelatina (Figura 32 e 33). Nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucho* identificamos mais *spots* com atividade gelatinolítica (24 *spots* e 10 *spots*, respectivamente) do que *spots* que foram reconhecidos nos imunoensaios (7 *spots* em *L. laeta* e 5 *spots* em *L. gaucho*). Para o veneno de *L. intermdia* as diferenças entre atividade e reconhecimento de anticorpos foram mais sutis, sendo que obtivemos o mesmo número (7) de *spots* nos dois ensaios, sendo que 4 são coincidentes.



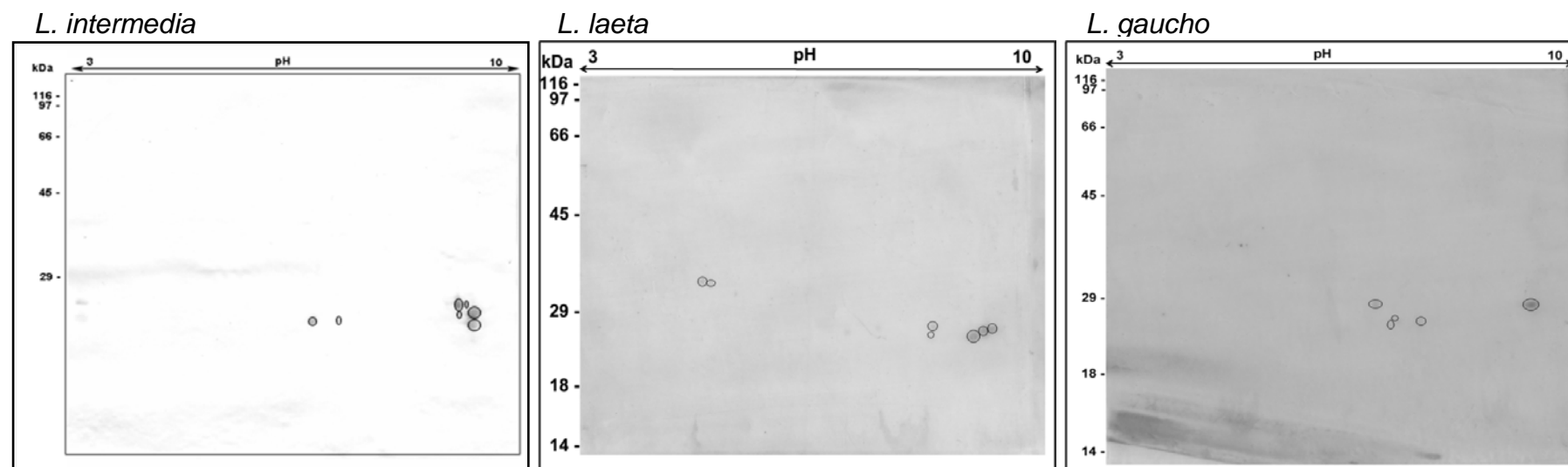


FIGURA 32: IMUNOREAÇÕES DOS VENENOS de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* COM ANTICORPOS QUE RECONHECEM A LALP1. As três figuras mostram o reconhecimento de spots por soro hiperimune anti-LALP1. No veneno de *L. intermedia* e *L. laeta* estão indicados os 7 spots com reação positiva, e no veneno de *L. gaucho* estão indicados os 5 spots reconhecidos pelo soro anti-LALP1. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular.

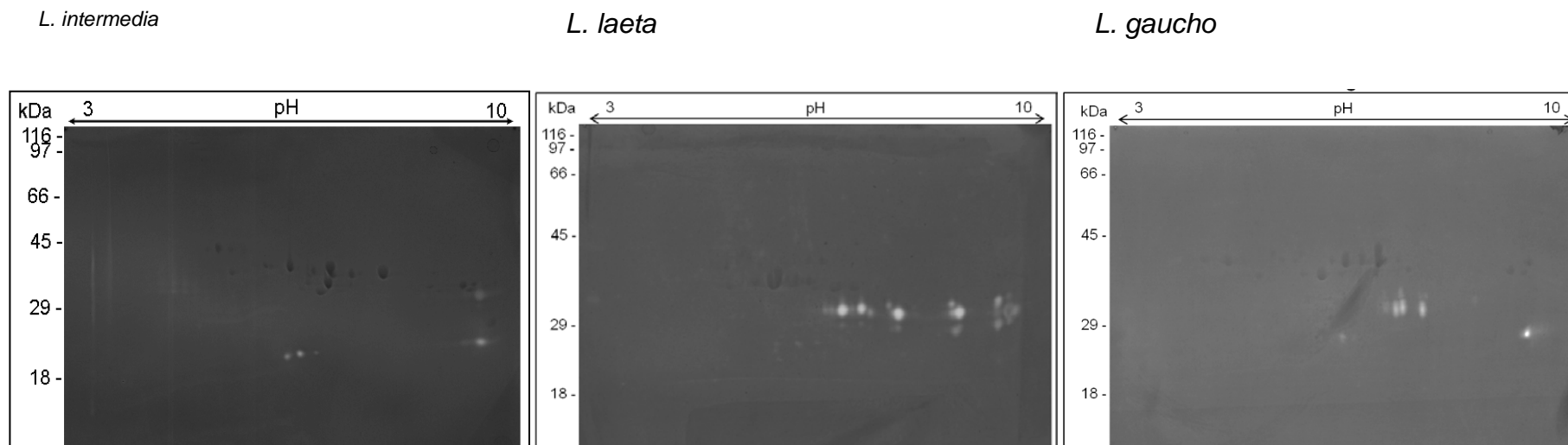


FIGURA 33: ZIMOGRAMA DE GELATINA DOS VENENOS DE *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*. Nos géis, os spots claros são devido à atividade gelatinolítica das proteínas dos venenos. Em *L. intermedia* foram identificados 7 spots, em *L. Laeta*, 24 spots, e em *L gaucho*, 10 spots. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular (kDa).

#### 4.3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ASTACINAS

Frente às diferenças obtidas nas análises dos subproteoma de astacinas (imunoensaios e zimogramas), optamos por realizar espectrometria de massas dos *spots* anti-LALP1 positivos e dos *spots* com atividade gelatinolítica com intuito de identificar as astacinas. Iniciamos os ensaios de espectrometria com veneno de *L. intermdia*, que é o veneno mais disponível e de fácil obtenção em nosso laboratório.

Amostras de 100 µg do veneno de *L. intermdia* foram, inicialmente, submetidas à corrida eletroforética bidimensional com fitas de pH 3-10 e coloração com Coomassie coloidal. (FIGURA 34). Alternativamente, realizamos também a corrida eletroforética bidimensional com fitas de pH 6-11 com intuito de melhorar a separação das astacinas. A focalização das proteínas do veneno de *L. intermdia* com fitas de pH 6-11 ficou satisfatória, mas não apresentou uma melhora significativa na separação dos *spots* de interesse (Figura 35). Para guiar a retirada dos *spots* de interesse, comparamos os géis com os *spots* positivos tanto no ensaio de imunodeteção com anti-LALP1 (Figura 36A) quanto no de atividade gelatinolítica (Figura 36B). Esses dois ensaios em fitas de pH 6-11 foram realizados somente uma vez e a focalização isoeétrica e separação eletroforética ficaram com má qualidade e precisam ser repetidas. Apesar desses géis da figura 36 serem de experimentos preliminares, foi possível observar positividade com anticorpos anti-LALP1 na região mais básica do gel e abaixo de 29 kDa, como também observado nos géis com gradiente de pH 3-10 (Figura 32A). No ensaio de zimograma com gradiente de pH 6-11 identificamos atividade de poucos *spots* (3), mas localizados na mesma região de identificação com anticorpos ant-LALP1 (Figura 36B). Frente à dificuldade de comparar imunoensaio (Figura 36A), zimograma (Figura 36B) e gel corado com Coomassie (Figura 35), retiramos vários *spots* para conseguir uma cobertura maior de possíveis astacinas. Portanto, retiramos 12 *spots* do gel da focalização em pH 6-11 (Figura 35) e do gel da focalização em pH 3-10 (Figura 34) retiramos 5 *spots* que foram coincidentes com os imunoensaios (Figura 32A) e com os ensaios de zimograma (Figura 33A). Além disso, retiramos 2 *spots* na região descrita para fosfolipases-D para serem utilizados como controle (Figura 34). A preparação para degradação trípica das proteínas iniciou com a descoloração completa dos *spots* e foi finalizada com a homogeneização dos peptídeos trípticos com a matriz que foi a

fonte de prótons para ionização dos peptídeos. A maioria das amostras não tinham peptídeos trípticos suficientes para coleta dos dados, mas após concentração dos peptídeos com ZipTips, obtivemos espectros de MS1 de boa qualidade, mas ainda não de todos os *spots*. Na figura 7 estão representados os espectros de massas obtidos. Nas primeiras tentativas por meio de PMF com buscas nos banco de dados Swiss-Prot e NCBI utilizando o MASCOT e sem utilizar filtro por taxonomia (selecionado todas as entradas), uma vez que não há um banco de dados específico para *Loxosceles*, não conseguimos identificações das astacinas. Porém, obtivemos identificação de fosfolipase-D dos dois *spots* controle (Fosfolipase-D isoforma 6 - A51\_Loxin), mostrando que o método utilizado para processamento de *spots* e identificação é adequado e se mostrou eficaz para identificação das toxinas loxoscélicas mais estudadas dos venenos de aranhas-marrons.

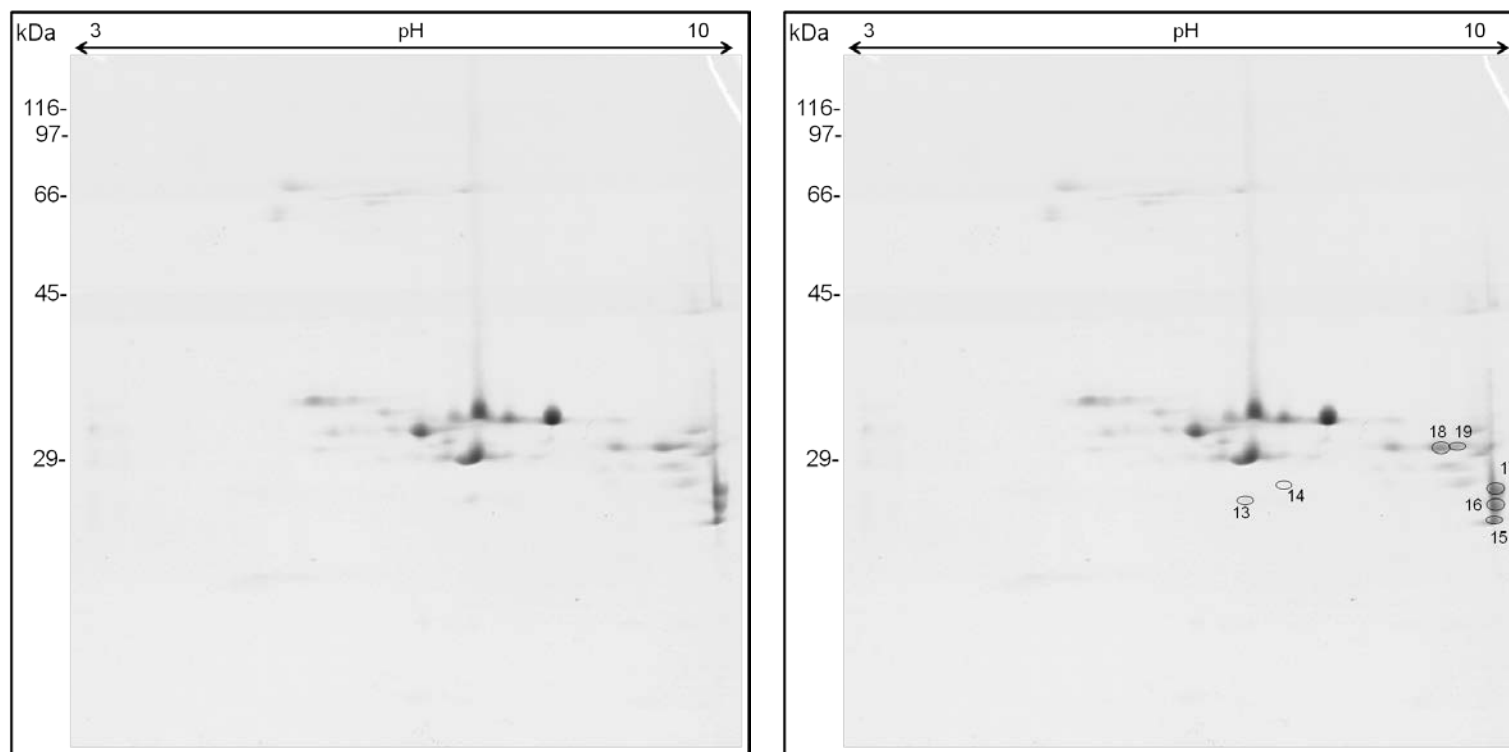


FIGURA 34: PERFIL PROTÉICO DO VENENOS DE *L. intermedia* APÓS FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM FITAS DE pH 3-10. As duas imagens representam o mesmo gel bidimensional, mas na direita estão indicados os spots retirados para análises por espectrometria de massas. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e na esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular (kDa)

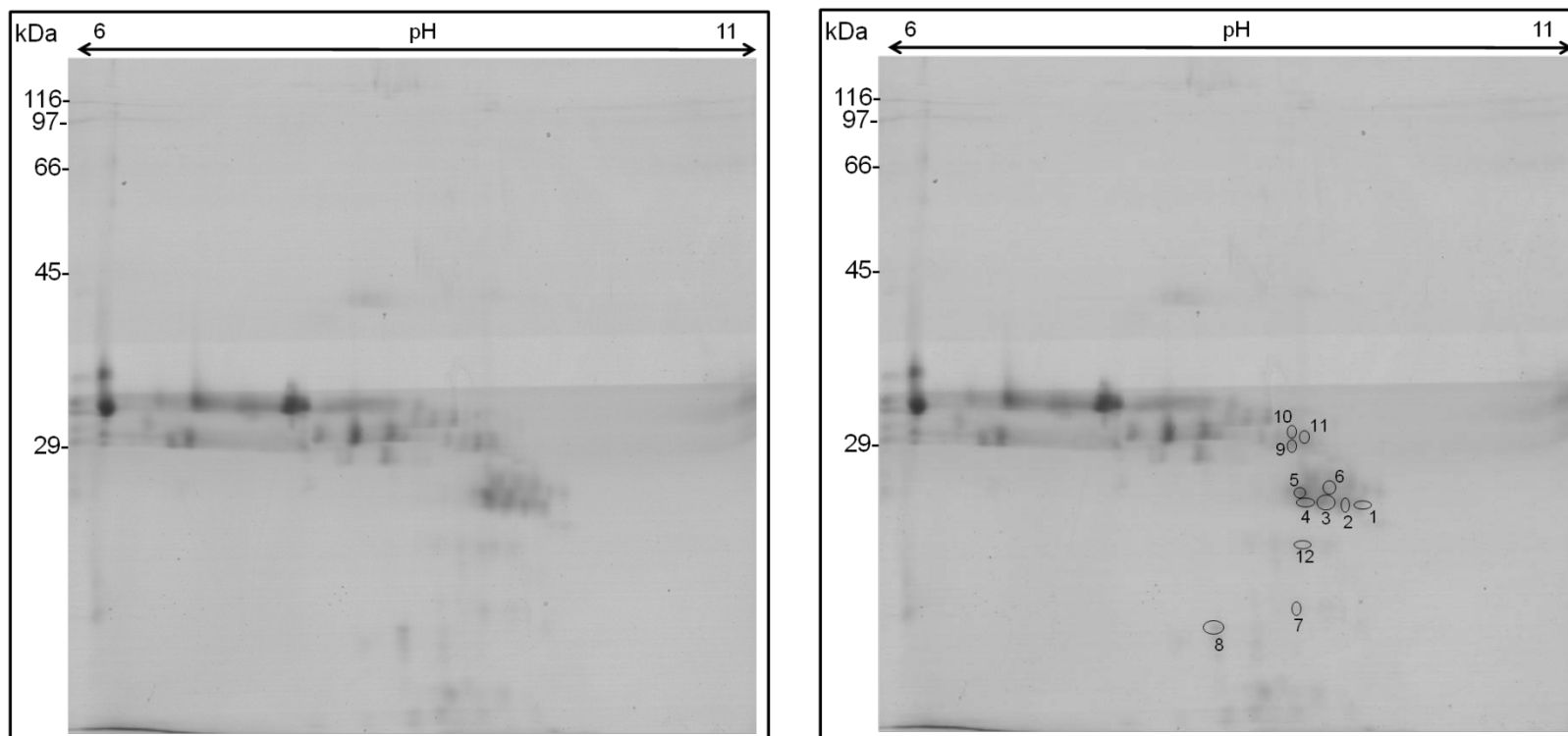


FIGURA 35: PERFIL PROTÉICO DO VENENOS DE *L. intermedia* APÓS FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM FITAS DE pH 6-11. As duas imagens representam o mesmo gel bidimensional,, mas na direita estão indicados os spots retirados para análises por espectrometria de massas. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e na esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular (kDa).

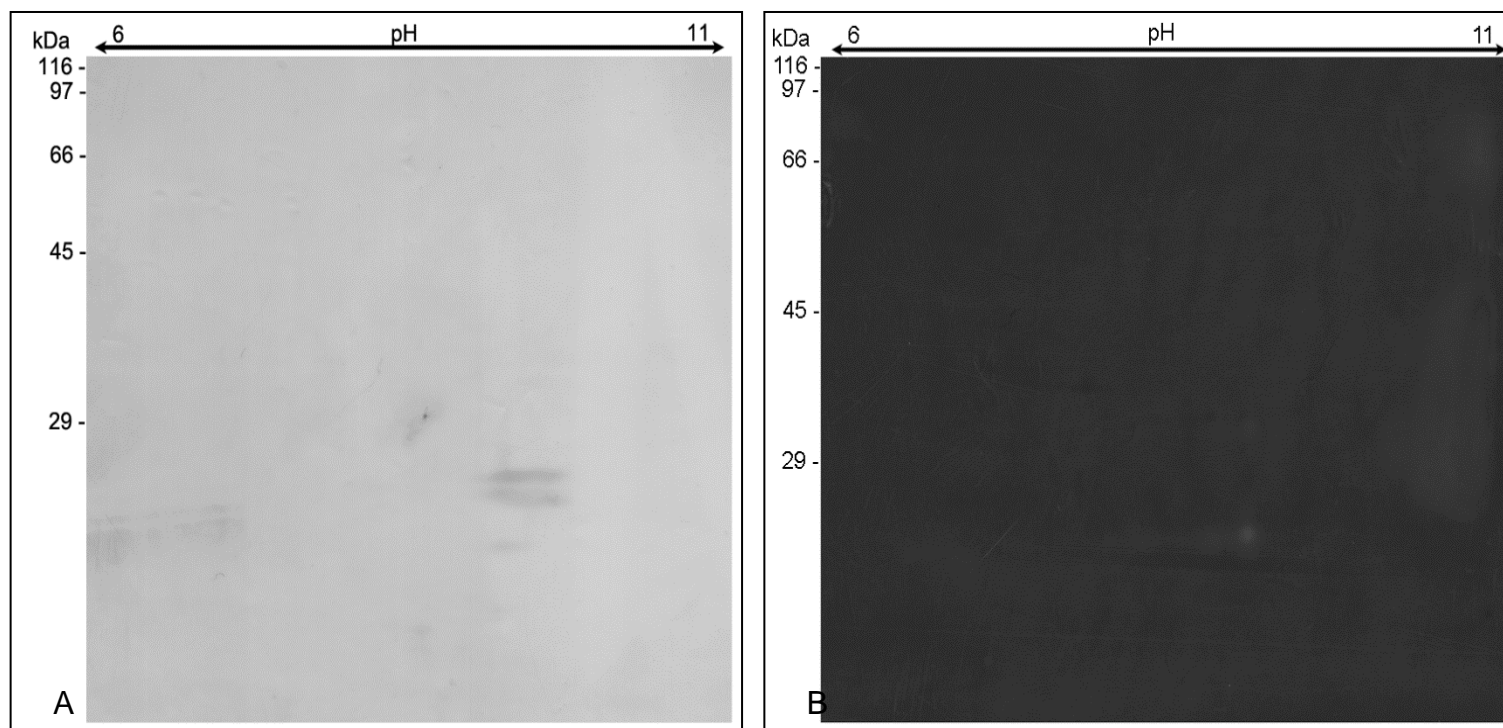


FIGURA 36: IMUNOREAÇÃO DO VENENO de *L. intermedia* COM ANTICORPOS QUE RECONHECEM A LALP1 E ZIMOGRAMA DE GELATINA APÓS FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM FITAS DE pH 6-11. (A) Imunodeteção (*western blotting*). (B) Zimograma de gelatina. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão indicados os marcadores de massa molecular (kDa).

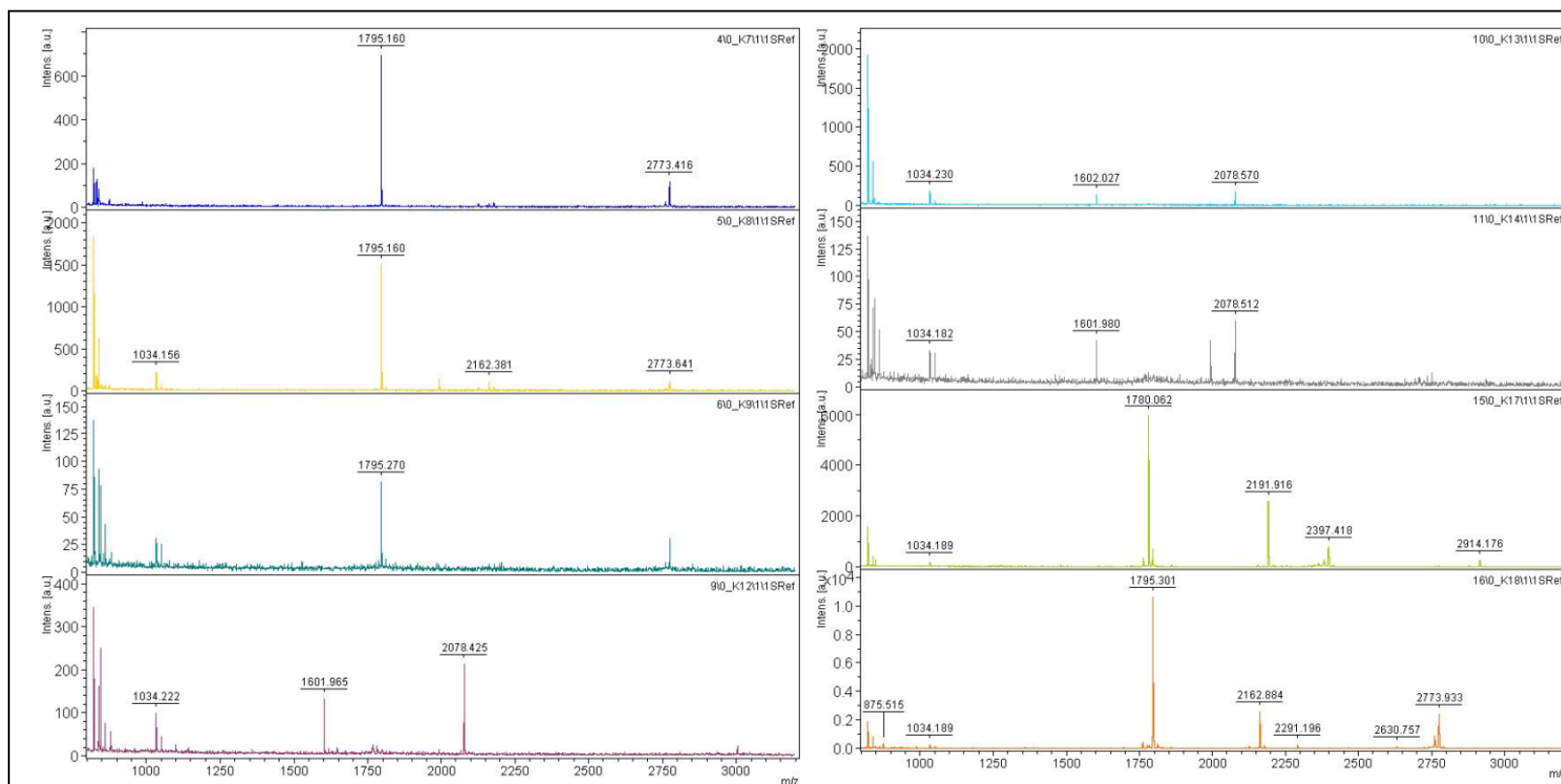


FIGURA 37: ESPECTROS DE MASSA DE PEPTÍDEOS TRÍPTICOS DE SPOTS DE INTERESSE DO VENENO DE *L. intermedia*. À esquerda estão os espectros referentes aos spots 4, 5, 6 e 9. À direita estão espectros dos spots 10, 11, 15 e 16.



Alternativamente, aumentamos a quantidade de amostra de veneno inicial (100 µg para 200 µg) e realizamos os procedimentos de preparação de 10 *spots* dos géis focalizados em fitas de pH 3-10 (Figura 38A) e 17 *spots* pH 6-11 (Figura 38B). Coletamos dados de MS (Figura 39) e dos três íons mais abundantes realizamos MS/MS e obtivemos espectros de massas de boa qualidade. Os dados de MS/MS foram utilizados para buscas nos mesmos bancos de dados anteriormente citados, mas novamente não obtivemos identificações. Por fim, utilizamos um banco de dados específico de *Loxosceles*, criado como descrito no item 4.3.7 do Materiais e métodos. Brevemente, o banco de dados de *Loxosceles* é composto por todas as sequências de *Loxosceles* presentes no Uniprot e sequências geradas no transcriptoma de glândulas de veneno de *L. intermedia* realizado pelo nosso grupo de pesquisa (GREMSKI et al., 2010). As buscas no banco de dados de *Loxosceles* foram realizadas somente com os valores de massa tríptica obtidos pela análise espectrométrica (MS) utilizando o programa Protein Prospector. Com essa estratégia de busca foi possível identificar somente um *spot*, com cobertura de 50% para sequência da LALP2 (*Loxosceles* astacin-like protease 2) (Figura 38B e 39). Esse *spot* identificado está na região que observamos positividade nos ensaios de *imunoblotting* com anticorpos policlonais anti-LALP1 (Figura 36A) e no ensaio de atividade gelatinolítica não foi possível estabelecer qual a posição exata desse *spot* identificado por espectrometria de massas (Figura 36B).

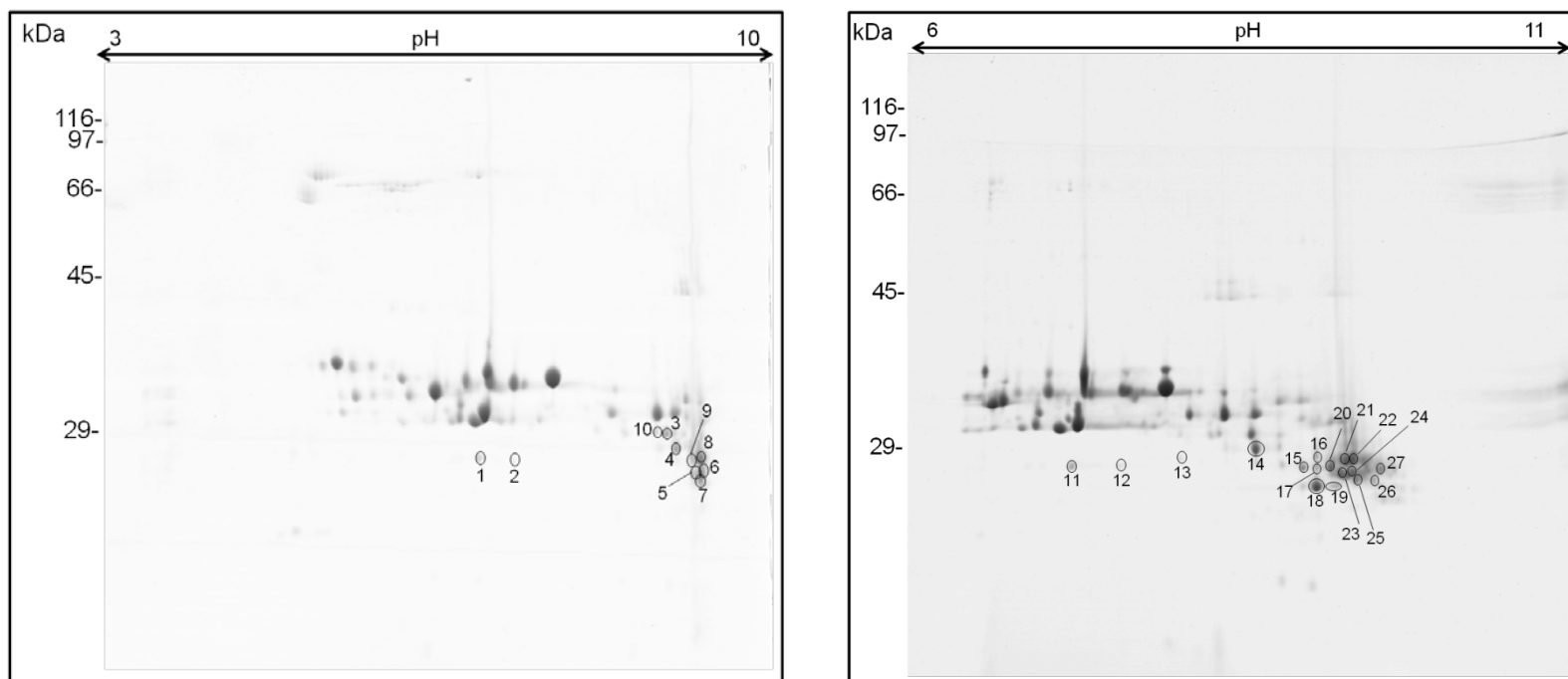


FIGURA 38: PERFIL PROTÉICO DE AMOSTRAS DE 200  $\mu$ g DE VENENO DE *L. intermedia*. A – Spots retirados do gel em que a amostra foi submetida à focalização em fita de pH 3-10. B - Spots retirados do gel em que a amostra foi submetida à focalização em fita de pH 3-10. Acima de cada figura está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão os marcadores de massa molecular (kDa).

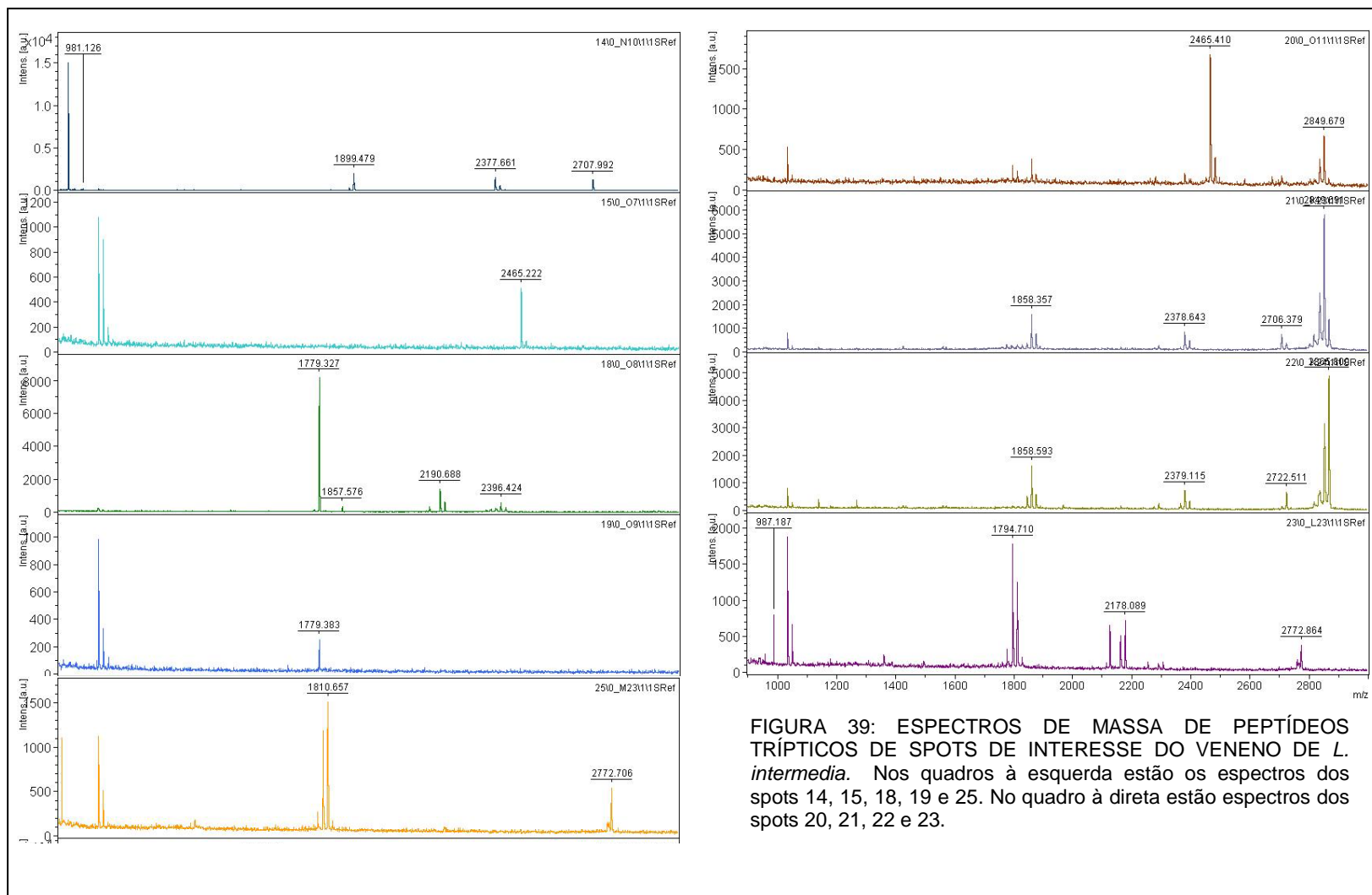


FIGURA 39: ESPECTROS DE MASSA DE PEPTÍDEOS TRIPTÍCOS DE SPOTS DE INTERESSE DO VENENO DE *L. intermedia*. Nos quadros à esquerda estão os espectros dos spots 14, 15, 18, 19 e 25. No quadro à direita estão espectros dos spots 20, 21, 22 e 23.

#### 4.3.4 IDENTIFICAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS

A dificuldade de identificação das proteínas de interesse com essa estratégia de espectrometria de massa muito provavelmente está relacionada à presença de modificações pós-traducionais, como glicosilação. Isso é bastante plausível porque a presença de açúcares em um peptídeo (MS1) ou resíduo de aminoácido (MS/MS) altera sua massa e não permite a identificação por comparação dos espectros experimentais com os espectros teóricos (banco de dados). Para avaliar a glicosilação dos *spots* de interesse, realizamos *lectin blotting* de géis 2-D para avaliar a presença ou ausência de glicosilação do tipo alta manose utilizando lectina GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) modificada com digoxigenina e anticorpo que reconhece digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina para revelação com BCIP/NBT. Foram obtidos vários *spots* positivos para glicosilação do tipo alta manose e migração eletroforética típica de glicoproteínas, com “arrastado”, sem possibilitar a identificação clara de cada *spot* separadamente, bem como a quantificação exata do número de *spots* positivos para glicosilação de alta manose (Figura 40). Porém, os *spots* da região entre 25-29 kDa com pI básico coincidem com os *spots* reconhecidos com os anticorpos anti-LALP1 (Figura 32A) e com atividade gelatinolítica (Figura 33A). Portanto, esses resultados em conjunto mostram a glicosilação das proteínas de interesse e justificam a dificuldade das identificações por espectrometria de massas. Para identificar as astacinas nativas, realizaremos a deglicosilação das proteínas dos venenos com endoglicosidase-F antes de realizarmos a eletroforese bidimensional e as análises proteômicas.

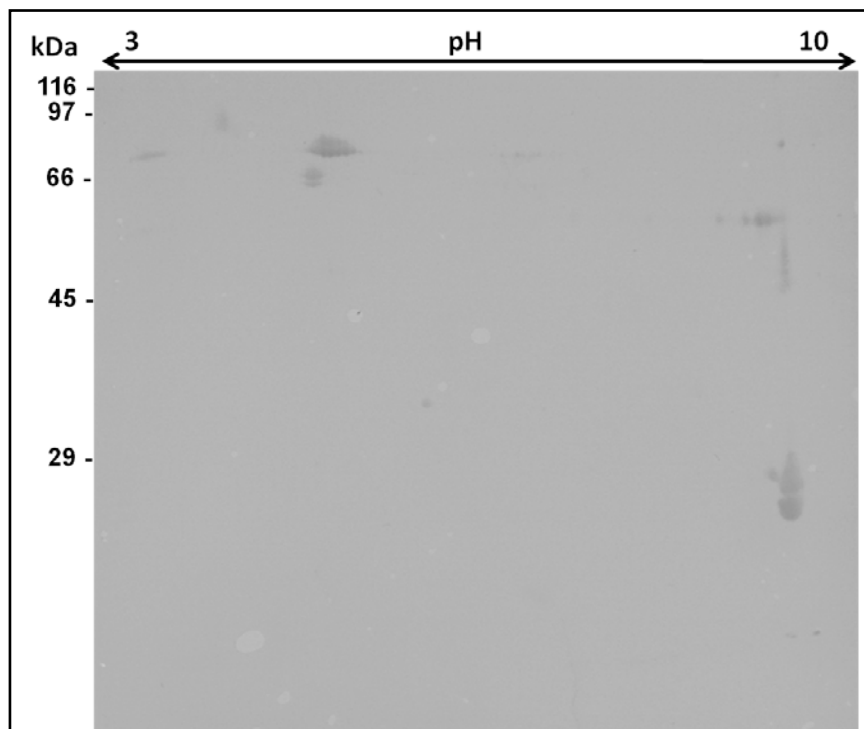


FIGURA 40: BLOTTING COM LECTINA GNA. Amostra de 100  $\mu$ g de veneno de *L. intermedia* foi utilizada para focalização isoeletrica em fitas de pH 3-10, seguida de eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%. Acima de está indicado o gradiente de pH e à esquerda estão os marcadores de massa molecular (kDa).

#### 4.4 DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos moleculares e celulares pelos quais as toxinas dos venenos loxoscélicos causam os sinais e sintomas do loxoscelismo está diretamente relacionada ao conhecimento dos componentes do veneno, bem como, das suas atividades bioquímicas e biológicas.

Os perfis proteicos dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha*, mostram predominância de proteínas na região de 30-35 kDa e corroboram com perfis proteicos bidimensionais apresentados em outros estudos (Luciano *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2005). No veneno de *L. gaucha*, nessa mesma região do perfil bidimensional, foram identificadas isoformas de fosfolipases-D, denominadas loxnecroginas. Muitos outros estudos caracterizaram como toxinas dermonecróticas proteínas na região de 30-35 kDa.

Com intuito de estudar uma classe de toxinas negligenciadas, as astacinas, realizamos o subproteoma de astacinas loxoscélicas do veneno das três espécies de maior importância médica no Paraná, *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucha*. Os dois ensaios utilizados para a obtenção dos subproteomas de astacinas loxoscélicas, imunoensaios 2-D com soro hiperimune anti-LALP1 e zimograma-2D de gelatina, foram escolhidos porque durante o desenvolvimento do mestrado, com anticorpos policlonais anti-LALP1 e avaliação da atividade gelatinolítica, foi possível identificar metaloproteases do tipo astacinas nos venenos de *L. laeta* e *L. gaucha* e, até aquele momento, tais proteases eram somente descritas como componentes de veneno de *L. intermedia* (Trevisan-Silva *et al.*, 2010). Ainda, os ensaios de zimograma para avaliar a atividade das astacinas possibilitaram a comparação entre os spots reconhecidos pelos anticorpos anti-LALP1 e os spots com atividade proteolítica.

Os ensaios de reconhecimento com os anticorpos anti-LALP1 obtivemos mais spots reconhecidos nos venenos de *L. laeta* e *L. Intermedia* do que em veneno de *L. gaucha*. Além disso, os zimogramas de gelatina mostraram maior número de spots em *L. laeta*, seguido de *L. gaucha* e *L. intermedia*. Portanto, esses resultados sugerem que o conteúdo de astacinas nos venenos das três espécies sejam diferentes.

Com abordagem similar - imunoensaios e zimogramas 2-D - foram identificadas metaloproteases e serinoproteases em venenos de 8 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. cotiara*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*,

*B. bilineata*, *B. erythromelas*, *B. insularis* e *B. neuwiedi*) (Paes-Leme *et al.*, 2009). Da mesma forma que não encontramos correlação de todos os spots reconhecidos com anticorpos policlonais anti-LALP1 com os spots que apresentaram atividade gelatinolítica, os resultados mostrados para as 8 espécies de *Bothrops* também não encontraram relação direta de presença de proteases com atividade gelatinolítica. Uma das sugestões dos autores foi a possibilidade de especificidade de substratos das proteases identificadas (Paes-Leme *et al.*, 2009). Essa sugestão é plausível e pode ser uma possibilidade para nossos achados, quando se trata dos spots que foram identificados pelos anticorpos, mas não apresentaram atividade gelatinolítica. Outra possibilidade é a limitação do método de zimograma utilizado, pois nesse ensaio, as proteínas são desnaturadas para corrida eletroforética e depois renaturadas com detergente não iônico para incubação com o tampão ótimo e avaliação de atividade. Nesse processo, algumas proteínas podem não renaturar e não apresentar atividade, isso pode ter acontecido com alguns spots avaliados no presente trabalho. Além disso, a gelatina co-polimerizada à poliácridamida pode gerar diferenças na mobilidade eletroforética quando comparado com géis sem gelatina.

Por outro lado, qual sugestão válida para a situação contrária? Spots que não foram reconhecidos pelos anticorpos, mas apresentaram atividade gelatinolítica. Uma hipótese é que os anticorpos utilizados foram produzidos com uma isoforma de astacina de veneno de *L. intermedia* e, portanto; pode não ser capaz de reconhecer epítomos de todas as isoformas existentes nos venenos das três espécies estudadas.

Os resultados aqui apresentados indicam a existência de mais isoformas de astacinas nos venenos estudados do que as já descritas na literatura científica (Da Silveira *et al.*, 2007c; Fernandes-Pedrosa *et al.*, 2008; Gremski *et al.*, 2010; Trevisan-Silva *et al.*, 2010). Entretanto, para confirmar essa observação e identificar as astacinas nativas, realizamos análises de espectrometria de massas dos spots de interesse do veneno de *L. intermedia*. As dificuldades encontradas para identificação das astacinas nativas foram a quantidade limitada de sequências proteicas do gênero *Loxosceles* depositadas nos bancos de dados mundiais e a presença de glicosilação de alta manose na maioria dos spots de interesse. Essas duas dificuldades apontadas são reforçadas pela identificação de dois spots de

fosfolipases-D utilizando bando de dados Swiss-Prot sem filtro por taxonomia. Essas enzimas, diferentemente das astacinas loxoscélicas, possuem maior número, ainda que pequeno, de sequências depositadas nos bancos de dados mundiais e não é descrito modificação pós-traducional de glicosilação. A ausência de glicosilação do tipo alta manose em fosfolipases-D observada no ensaio de western blotting com lectina GNA corrobora com dados da literatura (Veiga *et al.*, 1999). Machado e colaboradores (2005) relataram a dificuldade de identificação de spots de fosfolipases-D do veneno de *L. gaucho*. Após ausência de identificações por PMF e buscas diretas com dados de MS/MS no MASCOT, para conseguir as identificações das fosfolipases-D foi necessária a combinação de dados de sequenciamento de novo, sequenciamento amino-terminal e alinhamento das sequências obtidas no BLAST (do inglês, *basic local alignment search tool*) (Machado *et al.*, 2005). É compreensível essa dificuldade de identificações, visto que na época do estudo as sequências de *Loxosceles* eram mais escassas, pois os transcriptomas que geraram muitas sequências foram publicados somente 4 e 5 anos depois desse estudo proteômico.

A dificuldade de identificação de proteínas loxoscélicas é descrita mesmo utilizando estratégias proteômicas mais modernas. Em estudo proteômico com veneno de *L. intermedia* que utilizou digestão das proteínas do veneno em solução (estratégia *shotgun*) e separação dos peptídeos tripticos com cromatografia de troca iônica e cromatografia líquida de fase reversa acopladas ao espectrômetro de massas (método MudPiT), foram identificadas somente 39 proteínas utilizando banco de dados proteico do NCBI (Dos Santos *et al.*, 2009). Esse é um número baixo de identificações para uma análise de todos os componentes proteicos de venenos loxoscélicos. Uma vez que, analisando somente uma classe de toxinas, as fosfolipases-D, foram identificadas pelo menos 11 isoformas dessa toxina em veneno de *L. gaucho* (Machado *et al.*, 2005). Assim, o baixo número de identificações obtidas no proteoma de *L. intermedia*, revela a pequena quantidade de sequências proteicas de *Loxosceles* presentes nos bancos de dados disponíveis, os quais foram fonte de comparação das sequências desse estudo.

No presente estudo, construímos um banco de dados menor e somente com sequências de *Loxosceles* disponíveis no Uniprot e do transcriptoma de *L. intermedia* para auxiliar nas identificações. Com esse banco de dados foi possível a



identificação de uma astacina, o que não tínhamos conseguido em buscas com banco de dados maiores (NCBI e Swiss-Prot). A astacina identificada foi a LALP2; uma característica dessa proteína que pode ter facilitado a identificação é a ausência de possíveis sítios de N-glicosilação demonstrada pela análise da sequência aminoacídica deduzida. Essa característica diferencia a LALP2 das outras duas sequências de astacinas do veneno de *L. intermedia* (LALP1 e LALP3), as quais possuem 2 possíveis sítios de N-glicosilação.

Os ensaios de identificação de glicosilação do tipo alta manose com lectina GNA, mostraram que muitas proteínas do veneno de *L. intermedia* são glicosiladas, o que corrobora com dados da literatura (Veiga *et al.*, 1999). As reações positivas para glicosilação ficaram difEUs e não foi possível identificar com exatidão os spots glicosilados, mas eles coincidem com alguns spots da região de identificação com anticorpos anti-LALP1 e com atividade gelatinolítica dos zimogramas.

Porém, até o momento os ensaios de detecção de glicosilação foram realizados somente com focalização em gradiente de pH 3-10 e portanto, não conseguimos confirmar a ausência de glicosilação da astacina nativa do spot identificado como LALP2 (géis pH 6-11).

As alternativas para conseguir mais identificações das astacinas nativas são várias. A primeira, e possivelmente mais simples, será a deglicosilação das proteínas do veneno para gerar espectros experimentais com massa/carga iguais aos espectros teóricos disponíveis para comparação. Outra possibilidade é o sequenciamento de novo por espectrometria de massas e é provável que essa estratégia seja essencial para que possamos verificar se existem formas diferentes de astacinas, isso porque, as identificações por comparação nos mostrarão as sequências iguais as que já foram identificadas. Portanto, identificação das astacinas nativas dos venenos loxoscélicos dependerá de diferentes estratégias e métodos de estudo.

## 5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou a avaliação da expressão heteróloga de duas astacinas do veneno de *L. intermedia*, a LALP1 e LALP2, em diferentes cepas de *E. coli*. Nas várias condições testadas, as astacinas recombinantes foram expressas em corpos de inclusão e os métodos de redobramento *in vitro* possibilitaram a obtenção da LALP1 solúvel, mas não com atividade proteolítica frente à gelatina, ao fibrinogênio e à fibronectina. A utilização da proteína de fusão SUMO possibilitou a obtenção da LALP2 solúvel, sem a necessidade de redobramento *in vitro*, mas essa enzima não apresentou atividade proteolítica. Com esses resultados, não foi possível avaliar a atividade bioquímica e biológica das astacinas recombinantes, mas eles são a base para o avanço no delineamento de novas estratégias para obtenção das astacinas loxoscélicas solúveis e biologicamente ativas.

O estudo dos subproteomas de astacinas nativas dos venenos de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho* sugerem que a família das LALPs seja composta por um número maior de isoformas do que as descritas até o momento na literatura científica. Além disso, as comparações entre os venenos das diferentes espécies indicam que os três venenos possuem conteúdo de astacinas diferente. As análises por espectrometria de massas de spots de interesse do veneno de *L. intermedia* possibilitaram a identificação de uma astacina (LALP2). Com os resultados obtidos, foi possível concluir que a presença de glicosilação do tipo alta manose nas astacinas nativas dificultou identificações de mais astacinas e consequente confirmação das sugestões acima citadas. Novas abordagens serão realizadas para identificar os spots referentes às astacinas de *L. intermedia* e uma vez definida uma estratégia que possibilite essas identificações, serão realizadas com os venenos de *L. laeta* e *L. gaucho*.

A família das astacinas loxoscélicas apresenta potencial científico e a existência de diferentes isoformas dentro de cada espécie e dentro do gênero, mostram a relevância biológica dessas proteases. No contexto do loxoscelismo, as astacinas se apresentam como alvo para desenvolvimento de novos tratamentos e diagnóstico específicos. Para biologia de uma forma geral, as astacinas são uma fonte para produção de medicamentos, desenvolvimento de novos fármacos e utilização para estudos de diferentes eventos biológicos. Portanto, o melhor

conhecimento das astacinas loxoscélicas auxiliarão em diferentes áreas da ciência, como toxinologia, biotecnologia e biologia celular.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, R. M. G.; DE OLIVEIRA, K. C.; GIUSTI, A. L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 627-32, Apr 1999.

APPEL, M. H.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Insights into brown spider and loxoscelism. **ISJ**, v. 2, p. 152-8, 2005.

APPEL, M. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PALUDO, K. S.; SILVA, D. T.; CHAVES, D. M.; DA SILVA, P. H.; MANGILI, O. C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1780, n. 2, p. 167-78, Feb 2008.

ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. **Annu Rev Entomol**, v. 47, p. 395-433, 2002.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, Jan 15 2006.

BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 331-8, Mar 1992.

BARBARO, K. C.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 113-20, Jan 1994.

BARBARO, K. C.; FERREIRA, M. L.; CARDOSO, D. F.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 11, p. 1491-7, Nov 1996.

BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 489-99, Mar 15 2005.

BECKER-PAULY, C.; BRUNS, B. C.; DAMM, O.; SCHUTTE, A.; HAMMOUTI, K.; BURMESTER, T.; STOCKER, W. News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. **J Mol Biol**, v. 385, n. 1, p. 236-48, Jan 9 2009.

BHEEKHA-ESCURA, R.; MACGLASHAN, D. W.; LANGDON, J. M.; MACDONALD, S. M. Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2191-8, Sep 15 2000.

BINFORD, G. J.; WELLS, M. A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of *Haplogyne* spiders. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 135, n. 1, p. 25-33, May 2003.

BOMMER, U. A.; THIELE, B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 3, p. 379-85, Mar 2004.

BOND, J. S.; BEYNON, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. **Protein Sci**, v. 4, n. 7, p. 1247-61, Jul 1995.

BONIFAZI, F.; JUTEL, M.; BILO, B. M.; BIRNBAUM, J.; MULLER, U. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy: guidelines for clinical practice. **Allergy**, v. 60, n. 12, p. 1459-70, Dec 2005.

BORCHERT, N.; BECKER-PAULY, C.; WAGNER, A.; FISCHER, P.; STOCKER, W.; BRATTIG, N. W. Identification and characterization of onchoastacin, an astacin-like metalloproteinase from the filaria *Onchocerca volvulus*. **Microbes Infect**, v. 9, n. 4, p. 498-506, Apr 2007.

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRONDYK, W. H. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 131-47, 2009.

BURGESS, R. R. Refolding solubilized inclusion body proteins. **Methods Enzymol**, v. 463, p. 259-82, 2009.

CABRERIZO, S.; DOCAMPO, P. C.; CARI, C.; ORTIZ DE ROZAS, M.; DIAZ, M.; DE ROODT, A.; CURCI, O. Loxoscelism: epidemiology and clinical aspects of an endemic pathology in the country. **Arch Argent Pediatr**, v. 107, n. 2, p. 152-9, Apr 2009.

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1811, n. 2, p. 84-96, Feb 2011a.

CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; DA SILVEIRA, R. B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; SANCHES VEIGA, S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 211, n. 1, p. 64-77, Feb 15 2006.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins (Basel)**, v. 3, n. 3, p. 309-44, Mar 2011b.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O. M.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; GREMSKI, L. H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DA SILVEIRA, R. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 655-66, Jul 1 2009.

DA SILVA, P. H.; DA SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 693-709, Dec 1 2004.

DA SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; DOS SANTOS, F. A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Hematological cell findings in bone marrow and peripheral blood of rabbits after experimental acute exposure to *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 155-61, Aug 2003.

DA SILVEIRA, R.B. **Clonagem e Análise funcional de toxinas do veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*)**. 158p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2006.

DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 758-68, May 2007a.

DA SILVEIRA, R. B.; DOS SANTOS FILHO, J. F.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VON DIETRICH, C. P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 815-22, Jun 2002.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. **Biochimie**, v. 88, n. 9, p. 1241-53, Sep 2006.

DA SILVEIRA, R. B.; PIGOZZO, R. B.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; DREYFUSS, J. L.; TOMA, L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 289-300, Mar 2007b.

DA SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**, v. 406, n. 2, p. 355-63, Sep 1 2007c.

DAVIS, M. W.; BIRNIE, A. J.; CHAN, A. C.; PAGE, A. P.; JORGENSEN, E. M. A conserved metalloprotease mediates ecdysis in *Caenorhabditis elegans*. **Development**, v. 131, n. 23, p. 6001-8, Dec 2004.



DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; ARAUJO, S. C.; GABRIEL DE, M. Y.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 273-80, Sep 1 2004.

DE OLIVEIRA-CHRISTOFF, A.; DE OLIVEIRA, A.; CHAIM, O. M.; LUGARINI, D.; BASTOS PEREIRA, A. L.; PALUDO, K. S.; QUEIROZ TELLES, J. E.; BRACHT, A.; VEIGA, S. S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 695-704, Nov 2008.

DECREM, Y.; BEAUFAYS, J.; BLASIOLI, V.; LAHAYE, K.; BROSSARD, M.; VANHAMME, L.; GODFROID, E. A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS J**, v. 275, n. 7, p. 1485-99, Apr 2008.

DINIZ, M. R.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M.; NASCIMENTO CORDEIRO, M.; PIMENTA, A. M.; DE LIMA, M. E.; DINIZ, C. R. Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian "armed" spider, *Phoneutria nigriventer*. **Protein Expr Purif**, v. 50, n. 1, p. 18-24, Nov 2006.

DONG, K. Insect sodium channels and insecticide resistance. **Invert Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 17-30, Mar 2007.

DOS SANTOS, L. D.; DIAS, N. B.; PINTO, J. R. A. S.; PALMA, M. S. Brown Recluse Spider Venom: Proteomic Analysis and Proposal of a Putative Mechanism of Action. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 933-943, Aug 2009.

DOS SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; VIGGIANO, R. L.; DA SILVEIRA, R. B.; CANTAO, M. P.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia* (brown spider). **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 265-85, Feb 2000.

DUMERMUTH, E.; STERCHI, E. E.; JIANG, W. P.; WOLZ, R. L.; BOND, J. S.; FLANNERY, A. V.; BEYNON, R. J. The astacin family of metalloendopeptidases. **J Biol Chem**, v. 266, n. 32, p. 21381-5, Nov 15 1991.

ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 893-907, Sep-Oct 2000.

ESKAFI, F. M.; NORMENT, B. R. Physiological action of *Loxosceles reclusa* (G&M) venom on insect larvae. **Toxicon**, v. 14, n. 1, p. 7-13, 1976.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E.; MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 7, p. 1039-51, Jul 1998.

FERNANDES-PEDROSA MDE, F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008.

FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **BMC Genomics**, v. 9, p. 279, 2008.

FERRER, V. P. Clonagem e expressão heteróloga de hialuronidase e alérgeno presentes no veneno de aranha marrom (*Loxosceles intermedia*). 102p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2010.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am J Med Sci**, v. 304, n. 4, p. 261-7, Oct 1992.

GACHET, Y.; TOURNIER, S.; LEE, M.; LAZARIS-KARATZAS, A.; POULTON, T.; BOMMER, U. A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. **J Cell Sci**, v. 112 ( Pt 8), p. 1257-71, Apr 1999.

GAJARDO-TOBAR, R. Mi experiencia sobre loxoscelismo. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, n. 3, p. 689-698, 1966.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445-54, Jul 24 2008.

GARCIA-FRUITOS, E.; VAZQUEZ, E.; DIEZ-GIL, C.; CORCHERO, J. L.; SERAS-FRANZOSO, J.; RATERA, I.; VECIANA, J.; VILLAVERDE, A. Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. **Trends Biotechnol**, v. 30, n. 2, p. 65-70, Feb 2012.

GEREN, C. R.; CHAN, T. K.; HOWELL, D. E.; ODELL, G. V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Arch Biochem Biophys**, v. 174, n. 1, p. 90-9, May 1976.

GERTSCH, W. J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae, Scytodidae). Bull. **Am. Mus. Nat. Hist.**, v. 136, p. 117-174, 1967.

GOMEZ, H. F.; MILLER, M. J.; TRACHY, J. W.; MARKS, R. M.; WARREN, J. S. Intradermal anti-loxosceles Fab fragments attenuate dermonecrotic arachnidism. **Acad Emerg Med**, v. 6, n. 12, p. 1195-202, Dec 1999.

GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol Biotechnol**, v. 24, n. 2, p. 157-202, Jun 2003.

GOMIS-RUTH, F. X.; KRESS, L. F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **Embo J**, v. 12, n. 11, p. 4151-7, Nov 1993a.

GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKER, W.; HUBER, R.; ZWILLING, R.; BODE, W. Refined 1.8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin. **J Mol Biol**, v. 229, n. 4, p. 945-68, Feb 20 1993b.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol Biosyst**, v. 6, n. 12, p. 2403-16, Dec 2010.

HINOJOSA-MOYA, J.; XOCONOSTLE-CAZARES, B.; PIEDRA-IBARRA, E.; MENDEZ-TENORIO, A.; LUCAS, W. J.; RUIZ-MEDRANO, R. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. **J Mol Evol**, v. 66, n. 5, p. 472-83, May 2008.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. **Ann Emerg Med**, v. 44, n. 6, p. 608-24, Dec 2004.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet**, v. 378, n. 9808, p. 2039-47, Dec 10 2011.

ISBISTER, G. K.; GRAUDINS, A.; WHITE, J.; WARRELL, D. Antivenom treatment in arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 41, n. 3, p. 291-300, 2003.

JING, Y.; TOUBARRO, D.; HAO, Y.; SIMOES, N. Cloning, characterisation and heterologous expression of an astacin metalloprotease, Sc-AST, from the

entomoparasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 174, n. 2, p. 101-8, Dec 2010.

JONG, Y. S.; NORMENT, B. R.; HEITZ, J. R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*--II. Protease enzyme activity. **Toxicon**, v. 17, n. 6, p. 529-37, 1979.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M.; GONCALVES-DORNELAS, H.; DE CASTRO, C. S.; SILVESTRE, F. G.; LABORNE, F. V.; DE MOURA, J. F.; VEIGA, S. S.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GRANIER, C.; BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 7, p. 938-46, Dec 1 2007.

KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KUNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Database issue, p. D387-92, Jan 2009.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opin Biol Ther**, v. 11, n. 11, p. 1469-84, Nov 2011.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1722-36, Nov-Dec 2008.

LEE, S.; LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J**, v. 391, n. Pt 2, p. 317-23, Oct 15 2005.

LUCIANO, M. N.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; DOS SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; SOARES, M. F.; ZANATA, S. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown

spider) venom in renal tissue. **J Histochem Cytochem**, v. 52, n. 4, p. 455-67, Apr 2004.

LUNG, J. M.; MALLORY, S. B. A child with spider bite and glomerulonephritis: a diagnostic challenge. **International journal of dermatology**, v. 39, n. 4, p. 287, 2000.

MA, Q.; YU, Z.; HAN, B.; WANG, Q.; ZHANG, R. Expression and purification of lactacin Q by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. **J Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 326-31, Apr 2012.

MACHADO, L. F.; LAUGENSEN, S.; BOTELHO, E. D.; RICART, C. A.; FONTES, W.; BARBARO, K. C.; ROEPSTORFF, P.; SOUSA, M. V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 2167-76, May 2005.

MACHT, M.; MARQUARDT, A.; DEININGER, S. O.; DAMOC, E.; KOHLMANN, M.; PRZYBYLSKI, M. 'Affinity-proteomics': direct protein identification from biological material using mass spectrometric epitope mapping. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 4, p. 1102-1111, Feb 2004.

MALIQUE, C. M.; CASTRO-VALENCIA, J. E.; CARDOSO, J. L.; FRANCCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 3, p. 139-43, May-Jun 2002.

MALIQUE, C. M.; SANTORO, M. L.; CARDOSO, J. L.; CONDE, M. R.; NOVAES, C. T.; RISK, J. Y.; FRANCA, F. O.; DE MEDEIROS, C. R.; FAN, H. W. Clinical picture and laboratorial evaluation in human loxoscelism. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 664-71, Dec 1 2011.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M. L. *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) species distribution in the State of Parana. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 4, p. 331-5, Jul-Aug 2005.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1171-81, Jun 15 2005.

MCGLASSON, D. L.; BABCOCK, J. L.; BERG, L.; TRIPLETT, D. A. ARACHnase. An evaluation of a positive control for platelet neutralization procedure testing with seven commercial activated partial thromboplastin time reagents. **Am J Clin Pathol**, v. 100, n. 5, p. 576-8, Nov 1993.

MERCHANT, M. L.; HINTON, J. F.; GEREN, C. R. Sphingomyelinase D activity of brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom as studied by <sup>31</sup>P-NMR: effects on the time-course of sphingomyelin hydrolysis. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 537-45, Mar 1998.

MILLER, M. S.; ORTEGON, M.; MCDANIEL, C. Negative pressure wound therapy: treating a venomous insect bite. **Int Wound J**, v. 4, n. 1, p. 88-92, Mar 2007.

MOHRLLEN, F.; BOND, J. S.; STÖCKER, W. Other astacin homologues. Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn (Barrett, AJ, Rawlings, ND and Woessner, JF, eds), Elsevier, London, 2004.

MOHRLLEN, F.; HUTTER, H.; ZWILLING, R. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. **Eur J Biochem**, v. 270, n. 24, p. 4909-20, Dec 2003.

MONTEIRO, C. L.; RUBEL, R.; COGO, L. L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S. Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelism. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 409-18, Apr 2002.

NORMENT, B. R.; JONG, Y. S.; HEITZ, J. R. Separation and characterization of venom components in *Loxosceles reclusa*--III. Hydrolytic enzyme activity. **Toxicon**, v. 17, n. 6, p. 539-48, 1979.

OLIVEIRA, C. K.; GONCALVES DE ANDRADE, R. M.; GIUSTI, A. L.; DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. Sex-linked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 217-21, Jan 1999.

OLVERA, A.; RAMOS-CERRILLO, B.; ESTEVEZ, J.; CLEMENT, H.; DE ROODT, A.; PANIAGUA-SOLIS, J.; VAZQUEZ, H.; ZAVALA, A.; ARRUZ, M. S.; STOCK, R. P.; ALAGON, A. North and South American *Loxosceles* spiders: development of a polyvalent antivenom with recombinant sphingomyelinases D as antigens. **Toxicon**, v. 48, n. 1, p. 64-74, Jul 2006.

PAES-LEME, A. F.; KITANO, E. S.; FURTADO, M. F.; VALENTE, R. H.; CAMARGO, A. C. M.; HO, P. L.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. **Proteomics**, v. 9, n. 3, p. 733-745, Feb 2009.

PAIXAO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERG, C. W.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERNANDES-PEDROSA MDE, F.; OKAMOTO, C. K.; TAMBOURGI, D. V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 6, p. 1410-8, Jun 2007.

PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, n. 3, p. 323-33, Apr 2009.



PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 660-71, May 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 123-37, Aug 2006.

PEITSCH, M. C. Protein modeling by E-mail. **Biotechnology**, v. 13, p. 658-660, 1995.

PETERNEL, S.; GRDADOLNIK, J.; GABERC-POREKAR, V.; KOMEL, R. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. **Microb Cell Fact**, v. 7, p. 34, 2008.

PETI, W.; PAGE, R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. **Protein Expr Purif**, v. 51, n. 1, p. 1-10, Jan 2007.

PLATNICK, N.I. *The World Spider Catalog*, Version. 9.0.; American Museum of Natural History: New York, NY, USA, 2008.

PRAKASH, A.; PARSONS, S. J.; KYLE, S.; MCPHERSON, M. J. Recombinant production of self-assembling SZ-structured peptides using SUMO as a fusion partner. **Microb Cell Fact**, v. 11, n. 1, p. 92, Jul 3 2012.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Current Science**, v. 80, n. 9, p. 1121-1128, May 10 2001.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, n. 3, p. 225-54, Mar 2002.

RASMUSSEN, U.; GIESE, H.; MIKKELSEN, D. Induction and purification of chitinase in *Brassica napus* L. ssp. *Oleifera* infected with *Phoma lingam*, **Planta**, v. 187, p. 328-334, Dec 1992.

REYDA, S.; JACOB, E.; ZWILLING, R.; STOCKER, W. cDNA cloning, bacterial expression, in vitro renaturation and affinity purification of the zinc endopeptidase astacin. **Biochem J**, v. 344 Pt 3, p. 851-7, Dec 15 1999.

RIBEIRO, R. O.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. B.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; DE MOURA, J.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1162-74, Dec 15 2007.

SADE, Y. B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Molecular cloning, heterologous expression and functional characterization of a novel translationally-controlled tumor protein (TCTP) family member from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 1, p. 170-7, Jan 2012.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, v. 307, n. 1-2, p. 249-64, Jan 2008.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, L. E., JR. Necrotic arachnidism. **J Am Acad Dermatol**, v. 44, n. 4, p. 561-73; quiz 573-6, Apr 2001.

SATAKARNI, M.; CURTIS, R. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. **Protein Expr Purif**, v. 78, n. 2, p. 113-9, Aug 2011.

SCHENONE, H.; SAAVEDRA, T.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. Loxoscelism in Chile. Epidemiologic, clinical and experimental studies. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 31, n. 6, p. 403-15, Nov-Dec 1989.

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 3, p. 210-8, May-Jun 2008.

SEZERINO, U. M.; ZANNIN, M.; COELHO, L. K.; GONCALVES JUNIOR, J.; GRANDO, M.; MATTOSINHO, S. G.; CARDOSO, J. L.; VON EICKSTEDT, V. R.; FRANCA, F. O.; BARBARO, K. C.; FAN, H. W. A clinical and epidemiological study of *Loxosceles* spider envenoming in Santa Catarina, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 92, n. 5, p. 546-8, Sep-Oct 1998.

SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS – SINAN, Ministério da Saúde, BRASIL, 2012.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J Biotechnol**, v. 115, n. 2, p. 113-28, Jan 26 2005.

SOUZA, I. A.; CINO, E. A.; CHOY, W. Y.; CORDEIRO, M. N.; RICHARDSON, M.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; GOMEZ, M. V.; PRADO, M. A.; PRADO, V. F. Expression of a recombinant *Phoneutria* toxin active in calcium channels. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 907-18, Oct 2012.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci**, v. 4, n. 5, p. 823-40, May 1995.

SWANSON, D. L.; VETTER, R. S. Loxoscelism. **Clin Dermatol**, v. 24, n. 3, p. 213-21, May-Jun 2006.

SWEENEY, M. A.; GIL-PARRADO, S.; VINZENZ, D.; BERNARDI, A.; HEIN, A.; BODENDORF, U.; ERBEL, P.; LOGEL, C.; GERHARTZ, B. Structural basis for the substrate specificity of bone morphogenetic protein 1/tolloid-like metalloproteases. **J Mol Biol**, v. 384, n. 1, p. 228-39, Dec 5 2008.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W.; MORGAN, B. P.; DE ARAUJO, P. S.; ALVES, E. W.; DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 251, n. 1, p. 366-73, Oct 9 1998.

TAMBOURGI, D. V.; MORGAN, B. P.; DE ANDRADE, R. M.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n. 2, p. 683-91, Jan 15 2000.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, G. O.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v. 92, n. 1, p. 21-32, Jan 2010.

TREVISAN-SILVA D, GREMSKI LH, CHAIM O M, SENFF-RIBEIRO A, VEIGA SS. *Loxosceles* Astacin-Like Proteases (LALPs), an astacin metalloprotease family from the brown spider venom, Handbook of proteolytic enzymes, 3 ed, C. 86, Editora Elsevir, *in press*.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expr Purif**, v. 28, n. 1, p. 1-8, Mar 2003.

VEIGA, S. S.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUS, J. L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A. M.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 825-39, Jun 2000a.

VEIGA, S. S.; FEITOSA, L.; DOS SANTOS, V. L.; DE SOUZA, G. A.; RIBEIRO, A. S.; MANGILI, O. C.; PORCIONATTO, M. A.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R.; GREMSKI, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. **Histochem J**, v. 32, n. 7, p. 397-408, Jul 2000b.

VEIGA, S. S.; GREMSKI, W.; DOS SANTOS, V. L.; FEITOSA, L.; MANGILI, O. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P.; BRENTANI, R. R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 587-607, Apr 1999.

VEIGA, S. S.; ZANETTI, V. C.; BRAZ, A.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 7, p. 843-50, Jul 2001.

VETTER, R. S. Seasonality of brown recluse spiders, *Loxosceles reclusa*, submitted by the general public: implications for physicians regarding loxoscelism diagnoses. **Toxicon**, v. 58, n. 8, p. 623-5, Dec 1 2011.

VETTER, R. S.; BUSH, S. P. The diagnosis of brown recluse spider bite is overused for dermonecrotic wounds of uncertain etiology. **Ann Emerg Med**, v. 39, n. 5, p. 544-6, May 2002.

VETTER, R. S.; ISBISTER, G. K. Medical aspects of spider bites. **Annu Rev Entomol**, v. 53, p. 409-29, 2008.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **Int J Dermatol**, v. 37, n. 7, p. 481-96, Jul 1998.

WASSERMAN, G. S.; ANDERSON, P. C. Loxoscelism and necrotic arachnidism. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 21, n. 4-5, p. 451-72, 1983.

WRIGHT, R. P.; ELGERT, K. D.; CAMPBELL, B. J.; BARRETT, J. T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Arch Biochem Biophys**, v. 159, n. 1, p. 415-26, Nov 1973.

XIONG, X.; CHEN, L.; LI, Y.; XIE, L.; ZHANG, R. Pf-ALMP, a novel astacin-like metalloproteinase with cysteine arrays, is abundant in hemocytes of pearl oyster *Pinctada fucata*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1759, n. 11-12, p. 526-34, Nov-Dec 2006.

YIALLOUROS, I.; GROSSE BERKHOFF, E.; STOCKER, W. The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases. **FEBS Lett**, v. 484, n. 3, p. 224-8, Nov 10 2000.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335-347, 2007.

YOKOZAWA, Y.; TAMAI, H.; TATEWAKI, S.; TAJIMA, T.; TSUCHIYA, T.; KANZAWA, N. Cloning and biochemical characterization of astacin-like squid metalloprotease. **J Biochem**, v. 132, n. 5, p. 751-8, Nov 2002.

YOUNG, A. R.; PINCUS, S. J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 391-400, Feb-Mar 2001.

ZANETTI, V. C.; DA SILVEIRA, R. B.; DREYFUSS, J. L.; HAOACH, J.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. **Blood Coagul Fibrinolysis**, v. 13, n. 2, p. 135-48, Mar 2002.

ANEXOS



## ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

1 - Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity

Chaim OM, da Silveira RB, Trevisan-Silva D, Ferrer VP, Sade YB, Bóia-Ferreira M, Gremski LH, Gremski W, Senff-Ribeiro A, Takahashi HK, Toledo MS, Nader HB, Veiga SS, 2011.

Revista: Biochimica e Biophysica Acta, v. 1811(2), p. 84-96, 2011.

doi: [10.1016/j.bbalip.2010.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.11.005)

2 - Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes.

Chaim OM, Trevisan-Silva D, Chaves-Moreira D, Wille AC, Ferrer VP, Matsubara FH, Mangili OC, da Silveira RB, Gremski LH, Gremski W, Senff-Ribeiro A, Veiga SS.

Revista: Toxins, v. 3(3), p. 309-344, 2011.

doi: [10.3390/toxins3030309](https://doi.org/10.3390/toxins3030309)

3 - Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom.

Ullah A, de Giuseppe PO, Murakami MT, Trevisan-Silva D, Wille AC, Chaves-Moreira D, Gremski LH, da Silveira RB, Senff-Ribeiro A, Chaim OM, Veiga SS, Arni RK.

Revista: Acta Crystallographica Section F, v.67, p. 234-236, 2011.

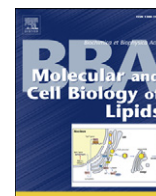
doi: [10.1107/S1744309110050931](https://doi.org/10.1107/S1744309110050931)

4 - Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge.

de Giuseppe PO, Ullah A, Silva DT, Gremski LH, Wille AC, Chaves Moreira D, Ribeiro AS, Chaim OM, Murakami MT, Veiga SS, Arni RK.

Revista: Biochem Biophys Res Commun, v. 409(4), p. 622-627, 2011.

doi: [10.1016/j.bbrc.2011.05.053](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.053)



## Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity

Olga M. Chaim<sup>a,b</sup>, Rafael B. da Silveira<sup>c</sup>, Dilza Trevisan-Silva<sup>b</sup>, Valéria P. Ferrer<sup>b</sup>, Youssef B. Sade<sup>b</sup>, Mariana Bóia-Ferreira<sup>b</sup>, Luiza H. Gremski<sup>a</sup>, Waldemiro Gremski<sup>b,d</sup>, Andrea Senff-Ribeiro<sup>b</sup>, Hélio K. Takahashi<sup>a</sup>, Marcos S. Toledo<sup>a</sup>, Helena B. Nader<sup>a</sup>, Silvio S. Veiga<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

<sup>c</sup> Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

<sup>d</sup> Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, Curitiba, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 August 2010

Received in revised form 10 November 2010

Accepted 11 November 2010

Available online 20 November 2010

#### Keywords:

Venom

*Loxosceles intermedia*

Dermonecrotic toxin

Phospholipase-D

Endothelial cell

Inflammatory response

### ABSTRACT

Brown spider dermonecrotic toxins (phospholipases-D) are the most well-characterized biochemical constituents of *Loxosceles* spp. venom. Recombinant forms are capable of reproducing most cutaneous and systemic manifestations such as dermonecrotic lesions, hematological disorders, and renal failure. There is currently no direct confirmation for a relationship between dermonecrosis and inflammation induced by dermonecrotic toxins and their enzymatic activity. We modified a toxin isoform by site-directed mutagenesis to determine if phospholipase-D activity is directly related to these biological effects. The mutated toxin contains an alanine substitution for a histidine residue at position 12 (in the conserved catalytic domain of *Loxosceles intermedia* Recombinant Dermonecrotic Toxin – LiRecDT1). LiRecDT1H12A sphingomyelinase activity was drastically reduced, despite the fact that circular dichroism analysis demonstrated similar spectra for both toxin isoforms, confirming that the mutation did not change general secondary structures of the molecule or its stability. Antisera against whole venom and LiRecDT1 showed cross-reactivity to both recombinant toxins by ELISA and immunoblotting. Dermonecrosis was abolished by the mutation, and rabbit skin revealed a decreased inflammatory response to LiRecDT1H12A compared to LiRecDT1. Residual phospholipase activity was observed with increasing concentrations of LiRecDT1H12A by dermonecrosis and fluorometric measurement *in vitro*. Lipid arrays showed that the mutated toxin has an affinity for the same lipids LiRecDT1, and both toxins were detected on RAEC cell surfaces. Data from *in vitro* choline release and HPTLC analyses of LiRecDT1-treated purified phospholipids and RAEC membrane detergent-extracts corroborate with the morphological changes. These data suggest a phospholipase-D dependent mechanism of toxicity, which has no substrate specificity and thus utilizes a broad range of bioactive lipids.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Dermonecrotic toxins are biologically and biochemically well-characterized constituents of the Brown spider (genus *Loxosceles*) venom complex mixture. Most of the described toxic effects associated with brown spiders, such as an intense inflammatory response at the bite site, hemostasis disorders, renal injury, platelet aggregation, and the typical necrotic lesion of the skin, can be experimentally reproduced using dermonecrotic toxins [1–5].

Histological findings for animals exposed to whole venom have shown subendothelial blebs, vacuoles, endothelial cell membrane degeneration of the blood vessel walls, and fibrin and thrombus

formation [6,7]. Moreover, Paludo et al. [8] demonstrated morphological alterations in an endothelial cell line derived from the rabbit aorta (RAEC) treated with whole venom such as cell retraction, homophilic disadhesion, and an increase in filopodia projections. In addition, venom was observed to bind to the cell surface and extracellular matrix. These direct cytotoxic effects on blood vessel cells could be responsible for triggering intense infiltration of inflammatory cells. In addition, they could indirectly lead to leukocyte and platelet activation, disseminated intravascular coagulation, and an increase in vessel permeability.

Dermonecrotic toxins are very characteristic and conserved molecules among *Loxosceles* species. Currently, more than ten complete mRNA sequences for *Loxosceles* spp. dermonecrotic toxins have been deposited in the nucleotide databases [3,9]. These toxins were biochemically reported as sphingomyelinase-D (or sphingomyelin phosphodiesterase D; E.C. 3.1.4.41) family members due to their

\* Corresponding author. Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil. Fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: [veigass@ufpr.br](mailto:veigass@ufpr.br) (S.S. Veiga).

ability to catalyze the hydrolysis of sphingomyelin [1,2]. Recently, Lee and Lynch [10] suggested that the dermonecrotic toxin family should be more accurately named phospholipases-D due to their additional hydrolytic activity upon glycerophospholipids.

Six isoforms of phospholipase-D were cloned from a cDNA library of *L. intermedia* gland venom and then expressed; they were shown to have similar toxic effects to those of native venom toxins [11–15]. Appel et al. [11] performed an alignment analysis of the cDNA-deduced amino acid sequences for LiRecDT1 (ABA62021), LiRecDT2 (ABB69098), LiRecDT3 (ABB71184), LiRecDT4 (ABD91846), LiRecDT5 (ABD91847), and LiRecDT6 (ABO87656). The results of this alignment corroborated the crystal structure analysis of a dermonecrotic toxin described by Murakami et al. [16] that suggested conserved residues at the proposed catalytic site.

Two histidine residues (H12 and H47) are postulated to be responsible for an acid–base reaction stabilized by  $Mg^{+2}$  ion coordination at the catalytic site. In the intermediate steps of the hypothetical mechanism, the His12 residue must be deprotonated for the subsequent nucleophilic attack of a water molecule to succeed. This mechanism can be followed by the final release of ceramide 1-phosphate (C1P) from the sphingomyelin substrate or lysophosphatidic acid (LPA) from a lysophospholipid [16,17].

Studies on lipid metabolism have shown that glycerophospholipids and sphingolipids are not simply structural constituents of cell membranes. Bioactive lipid mediators have been shown to play a major role in complex signaling pathways that control several cellular dynamics such as cell growth, survival, differentiation, and motility. They have also been shown to play roles in various pathophysiologic processes, all of which involve several G-protein-coupled receptors (GPCRs) and kinase cascades [18–20].

Pettus et al. [21] showed that C1P, rather than ceramide, functions as the proximal mediator of arachidonic acid release. Exogenous C1P alone can stimulate arachidonic acid release and prostaglandin E2 formation. Treatment of cells with spider venom sphingomyelinase-D to produce C1P from membrane sphingomyelin can elicit the arachidonic acid response [22]. Likewise, phospholipase-D can induce LPA formation by catalyzing the hydrolysis of a lyso-phospholipid precursor. In quiescent fibroblasts, exogenous PLD (from *Streptomyces chromofuscus*) generated bioactive LPA from pre-existing lysophosphatidylcholine in the outer membrane leaflet, resulting in the activation of G-protein-coupled LPA receptors and subsequent activation of the Ras, Rho, and  $Ca^{2+}$  signaling pathways [23]. Similarly, recombinant SMaseD from *L. laeta* was able to hydrolyze lysophosphatidylcholine to produce LPA and choline. Recombinant PLD from *L. reclusae* also degraded several purified lysophospholipids and sphingomyelin substrates [10,24]. Gene expression profiles of human fibroblasts treated with *L. reclusae* isoform I recombinant toxin (SMD) showed the upregulation of genes related to human cytokines and genes involved in the glycosphingolipid metabolism pathway. Furthermore, they speculated that sphingomyelinase activity on cell membranes, which results in ceramide 1-phosphate (C1P) production, induces the pro-inflammatory molecules NF- $\kappa$ B and IL-8 [25].

In the literature, there are several proteins with enzymatic activities (as well as catalytic domain structures) that are not responsible for the toxicity observed in experimental systems. Snake venom phospholipases A2 (PLA2) present remarkable diversity in their biological effects in addition to their catalytic activity. Sequence alignment analyses of functionally related PLA2 are frequently used to predict the structural determinants of these effects, and the predictions are subsequently evaluated by site-directed mutagenesis experiments and functional assays [26]. In this way, Sakamoto et al. [27] demonstrated that modified CyaAs (calmodulin-dependent adenylate cyclases from *Bordetella pertussis*) display hemolytic activity identical to the original toxin.

The absence of a clear correlation between catalysis and pharmacological activity and the diversity of biological effects raises

questions regarding the structural basis of these biological functions. Nephrotoxicity and hemolysis directly induced by phospholipase-D activity were already reported in literature [10,28,29]. However, dermonecrosis *in vivo* and inflammatory response triggered by brown spider phospholipase-D toxin were not yet described as directly dependent on its catalytic activity. In this report, we used a site-directed mutagenesis strategy to clone and express a mutated form of the previously reported dermonecrotic toxin known as LiRecDT1 (ABA62021) [12]. The substitution of a histidine residue at position 12 in the amino acid sequence with an alanine was performed to modify the organization of the active site and interfere with the catalytic reaction of the enzyme.

We investigate the correlation between the toxicity reported in loxoscelism (mainly characterized by dermonecrosis and inflammatory disturbance) and the biochemical and catalytic mechanism of phospholipase-D. We report evidence demonstrating the dependence of the biological effects on phospholipase-D activity of dermonecrotic toxin *in vivo* and *in vitro*, bringing new insights to the molecular mechanism of phospholipase-D activity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Whole venom from *L. intermedia* obtained by electrostimulation (15 V) of the cephalothorax of spiders captured in the wild was solubilized in PBS and maintained frozen until used, as described by Feitosa et al. [30]. Polyclonal antibodies to *L. intermedia* phospholipase-D toxin and whole venom were produced in rabbits as described by Chaim et al. [12]. Hyperimmune IgGs were purified from sera using a mixture of Protein-A and Protein-G Sepharose beads (GE Healthcare, Chalfont St Giles, England), as recommended by the manufacturer. Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG and alkaline phosphatase-conjugated or peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

### 2.2. Site-directed mutagenesis of LiRecDT1

Cloning from the venom gland cDNA library was performed following the methods of Chaim et al. [12]. GenBank data deposition information for *L. intermedia* cloned cDNA can be found under LiRecDT1 (DQ218155). The cDNA corresponding to the mature phospholipase-D original protein was amplified by PCR. The sense primer used was 30Rec (5'-CTCAGGCAGGTAATCGTCGGCCTATA-3'), which was designed to contain a XhoI restriction site (underlined) plus the sequence for the first seven amino acids of the mature protein. The antisense primer used was 30Rec (5'-CGGGATCCT-TATTTCTTGAATGTCACCA-3'), which contains a BamHI restriction site (underlined) and a stop codon (bold). The PCR product was cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, USA), subcloned into pET-14b (Novagen, Madison, USA) and digested with XhoI and BamHI. The mutated toxin was obtained using the Megaprimer PCR method adapted from Sambrook and Russell [31]. This protocol was performed using three rounds of PCR to carry out site-directed mutagenesis in the LiRecDT1 sequence, and the resulting mutated toxin was named LiRecDT1 H12A. Briefly, the first round of PCR included site-directed mutagenesis of the first histidine amino acid residue using the forward primer T7, which anneals to the pSPORT vector 5' portion, and the special reverse primer P1H12A (5'-ATTACCATGGGCCCCATGATC-3'), which contains the codon substitute for alanine plus the sequence for the other original amino acids. The "megaprimer" for the next round was obtained by agarose gel electrophoresis of the first PCR product (~200 bp) and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). In the second step, PCR was performed to obtain the mutated product using the "megaprimer" as the sense primer and 30Rec as the antisense

primer (3' BamHI restriction site). The second PCR product was subjected to the same protocol of agarose gel purification. In the final step of mutagenesis, a third PCR reaction was performed to insert the 5' XhoI restriction site from the second PCR product by using 30Rec as the sense primer and 30Rec as the antisense primer. Finally, this last PCR product was digested with restriction enzymes and purified by agarose gel electrophoresis. The mutated product was then cloned into the pGEM-T vector (Promega) and subcloned into pET-14b (Novagen). The correct construct was confirmed by miniprep sequencing.

### 2.3. Original (LiRecDT1) and mutated LiRecDT1 (LiRecDT1 H12A) recombinant toxin expression and purification

Both recombinant constructs were expressed as fusion proteins with a poly-(6X) His tag at the N-terminus as previously described by Chaim et al. [12]. Briefly, pET-14b/L. *intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *E. coli* BL21(DE3)pLysS competent cells (Invitrogen). Expression conditions were standardized for induction with IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside) for 3.5 h at 30 °C in 1 L of LB broth cultures. Cell suspensions were sonicated with six 10-second cycles at low intensity, and lysed materials were centrifuged (20,000  $\times$ g, 20 min). The recovered supernatants were incubated for affinity chromatography with 1 ml of Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose beads for 1 h at 4 °C. Recombinant protein/beads suspensions were loaded into a column and exhaustively washed until the OD at 280 nm reached 0.01 (washing buffer: 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole). Recombinant proteins were eluted with 10 ml of elution buffer (washing buffer, but 250 mM imidazole). Protein expression analysis on 12.5% SDS-PAGE was performed for purity and was stained with Coomassie Blue dye. For experimental negative controls, a recombinant toxin with similar molecular mass and obtained from the same cDNA library was used. This control toxin was characterized as an "astacin-like metalloprotease" [32] and caused no dermonecrosis, as evidenced by the dermonecrotic assay following injection into rabbit skin (data not shown).

### 2.4. Circular dichroism spectra measurements

Recombinant original and mutated toxins were dialyzed at 4 °C against 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and their spectra were recorded in a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) using a 1-mm gap cuvette. Each reported spectrum (0.5 nm interval) is the average of eight measurements performed at a rate of 50 nm/min using a response time of 8 s and a bandwidth of 1 nm. The temperature was kept constant at 25 °C.

### 2.5. Phospholipase activity assay

Phospholipase-D activity was measured using the Amplex Red Assay Kit (Molecular Probes, Eugene, USA). In this assay, phospholipase-D activity was monitored using 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex Red reagent), a sensitive fluorogenic probe for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. First, phospholipase hydrolyzes sphingomyelin to yield C1P and choline. Choline is oxidized by choline oxidase to betaine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of horseradish peroxidase reacts with Amplex reagent in a 1:1 stoichiometry to generate the highly fluorescent product resorufin. Recombinant toxins (10  $\mu$ g each to start, in three trials; later 100, 250 and 500  $\mu$ g of LiRecDT1 H12A) were added to the Amplex Red reagent mixture to a final volume of 500  $\mu$ l. The reaction tubes were incubated at 37 °C in a water bath for 30 min and fluorescence was measured in a fluorometer (Shimadzu Model RF-5301 PC Fluorescence Spectrophotometer) using excitation at 560 nm and emission detection at 590 nm. The controls were LALP (loxoscelis astacin-like protease) [32] for a negative control and whole venom for a positive control. Sphingomy-

elinase (0.004 U) from *Bacillus cereus* (1 U = 1  $\mu$ mol min<sup>-1</sup>) was co-tested, and fluorescence intensity was used as standard for comparing ends. Fluorescence intensity values were converted to units of phospholipase activity, which were expressed as  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> (amount of substrate hydrolyzed per minute).

### 2.6. Animals

Adult rabbits weighing approximately 3 kg obtained from the Central Animal House of the Federal University of Paraná were used for *in vivo* experiments with recombinant toxins. All experimental protocols using animals were performed according to the "Principles of laboratory animal care" (NIH Publication no. 85-23, revised 1985) and the "Brazilian Federal Laws" as well as the ethical committee agreement number 246 of the Federal University of Paraná.

### 2.7. Dermonecrosis *in vivo*

For the evaluation of dermonecrotic effects, 10  $\mu$ g of each toxin was injected intradermally into a shaved area of the rabbit skin for the first experiments. Animals were observed over the course of dermonecrotic lesion evolution. The LiRecDT1 H12A residual activity experiment was performed under the same conditions, except that doses were increased to 100, 250, and 500  $\mu$ g of mutated toxin. Acquisition of macroscopic pictures was performed after 4 h and 24 h of toxin application, and skin samples were collected at the end of the experiment for microscopic analysis and myeloperoxidase (MPO) activity assay.

### 2.8. Tissue MPO activity assay

The activity of tissue MPO was also assessed 24 h after injection of toxins into the rabbit skin, according to a technique modified from Bradley et al. [33,34]. Briefly, samples were placed in 0.75 ml of 80 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 5.4, containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide, and then homogenized (45 s at 0 °C) in a motor-driven homogenizer. The homogenate was decanted into a microfuge tube, and the vessel was washed with 0.75 ml of hexadecyltrimethylammonium bromide in buffer. The wash was added to the tube, and the 1.5-ml sample was centrifuged at 12,000  $\times$ g at 4 °C for 15 min. Triplicate 30  $\mu$ l samples of the resulting supernatant was added to 96-well microtiter plates. For the assay, 200  $\mu$ l of a mixture containing 100  $\mu$ l of 80 mM PBS, pH 5.4, 85  $\mu$ l of 0.22 M PBS, pH 5.4, and 30  $\mu$ l of 0.017% hydrogen peroxide was added to the wells. The reaction was started with the addition of 20  $\mu$ l 18.4 mM tetramethylbenzidine HCl in dimethylformamide. Plates were incubated at 37 °C for 10 min, and then the reaction was stopped by the addition of 30  $\mu$ l of 1.46 M sodium acetate, pH 3.0. Enzyme activity was determined colorimetrically using a plate reader (EL808, BioTech Instruments, Inc.) set to measure absorbance at 630 nm and was expressed as mOD/mg tissue.

### 2.9. Histological procedure for light microscopy

Skin samples were collected from rabbits anesthetized with ketamine (Agribands, Paulinia, Brazil) and acepromazine (Univet, São Paulo, Brazil) and then fixed in Bouin's fixative solution (picric acid saturated solution, 750 ml; formaldehyde 36–40%, 250 ml; acetic acid, 50 ml) for 16 h at room temperature. After fixation, samples were dehydrated in a graded series of ethanol before being paraffin embedded (for 2 h at 58 °C). Then, thin tissue sections (4  $\mu$ m) were processed and stained with hematoxylin and eosin (H&E).



### 2.10. Immunological cross-reactivity of original and mutated toxin

The protein content of experimental samples was determined by the Coomassie Blue method (BioRad, Hercules, USA). For immunoblotting, 5 µg of each toxin was subjected to 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions, transferred onto nitrocellulose filters overnight and immunostained with hyperimmune sera (either against phospholipase-D toxin or whole venom). Secondary alkaline phosphatase-coupled anti-IgG were detected and visualized using the BCIP/NBT substrate reaction. For the antibody capture assay (ELISA), tests were performed in pentaplicate with 10 µg/ml of venom and LiRecDTs toxins as antigens. Purified hyperimmune IgGs, anti-LiRecDT1, and anti-whole venom were tested (0.1–1 µg/ml), followed by detection with secondary peroxidase-coupled anti-IgG and reading of the absorbance at 450 nm for the OPD substrate reaction [35].

### 2.11. Protein–lipid overlay assay (fat blot)

The affinity of toxins for specific lipids was tested using the SphingoStrips recommended method (Molecular Probes, Eugene, USA). In summary, nitrocellulose membranes containing 100 pmol samples of 15 different lipids and a blank sample were blocked using Tris-buffered saline plus 0.02% Tween-20 (TBS-T) with 3% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) and gently agitated for 1 h at room temperature. Then, the membranes were incubated with 0.5 µg/ml of the toxins (whole venom, LiRecDT1, or LiRecDT1 H12A) in TBS-T plus 3% BSA at 4 °C overnight. Membranes were then washed with TBS-T plus 3% BSA three times for 10 min using gentle agitation. Toxin binding was detected using anti-venom or anti-LiRecDT1 purified IgGs and revealed by alkaline phosphatase-labeled secondary antibodies and BCIP/NBT substrate.

### 2.12. Cell culture conditions

RAEC (rabbit aorta endothelial cells) were grown as monolayer cultures in F12 medium containing gentamicin (40 mg/L) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. For inverted light microscopy observation and confocal immunofluorescence analysis, release of cells was performed by treatment with 0.25% trypsin/EDTA for a few minutes. After counting, the cells were resuspended in an adequate volume of medium supplemented with FCS, and  $5 \times 10^3$  cells were replated on glass coverslips (13 mm diameter) and allowed to adhere and grow for 48 h. The cells were then incubated in the presence of the recombinant toxins (10 µg/ml). Changes in cell morphology were evaluated and photographed using an inverted microscope (Leica-DMIL, Wetzlar, Germany) at 1 h and 4 h after recombinant toxin addition. The same experimental conditions were used with control cells, except that the medium contained appropriate amounts of vehicle (PBS) instead of recombinant toxins.

### 2.13. RAEC immunofluorescence assay

For immunofluorescence microscopy, after recombinant toxins exposure for 4 h at 37 °C, RAEC cells were rapidly washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde in PBS for 30 min at 4 °C, incubated with 0.1 M glycine for 3 min, and blocked with PBS containing 1% BSA for 1 h at room temperature. Coverslips were incubated for 1 h with polyclonal antibodies raised against phospholipase-D (2 µg/ml) as described in the Reagents section. Cells were washed three times with PBS, blocked with PBS containing 1% BSA for 30 min at room temperature, and then incubated with Alexa® 488-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (Molecular Probes) at room temperature for 40 min. After washing, samples were mounted using Fluoromont-G (Sigma) and observed under a fluorescence confocal

microscope (Confocal Radiance 2100, BioRad) coupled to a Nikon-Eclipse E800 with Plan-Apochromatic objectives (Sciences and Technologies Group Instruments Division, Melville, USA).

### 2.14. Choline release detection from RAEC cell extract

Extracts of RAEC cell membranes were obtained from approximately  $5 \times 10^6$  cells (150 cm<sup>3</sup> culture bottle). Cells were scraped and resuspended in 1 ml of cold extraction buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 0.5%). After gently homogenizing for 10 min at 4 °C, cells were centrifuged at 20,000×g for 20 min at 4 °C and supernatants were collected for later use. RAEC cells extracts (100 µl) were utilized as a substrate for LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A (both in two concentrations, 50 µg and 100 µg) in a total final volume of 250 µl for 1 h at 37 °C and gently mixed using a rotational shaker in a BOD incubator. Treated extracts were then added to a 250 µl reaction mixture adapted from the Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (Molecular Probes) containing choline oxidase (4 U), alkaline phosphatase (80 U), horseradish peroxidase (20 U), and Amplex Red reagent (100 µM), excluding sphingomyelin substrate. After incubation in a water bath for 1 h at 37 °C, fluorescence development was measured in a fluorometer (Shimadzu Model RF-5301 PC Fluorescence Spectrophotometer) using excitation set at 560 nm and emission detection at 590 nm.

### 2.15. Lipid analysis by high-performance thin-layer chromatography

For analysis of hydrolysis, recombinant toxins (50 µg) were incubated with RAEC cell extracts (50 µl or 100 µl) for 3, 8 or 16 h, and purified phospholipids for 3 h at 20 °C. Lipids present in these detergent-soluble samples were recovered directly by partition with 2 ml of water-saturated 1-butanol; the butanol fraction was dried, resuspended in chloroform, and analyzed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Analytical HPTLC was performed on silica gel 60 plates (E. Merck, Darmstadt, Germany) using chloroform–methanol–methylamine 40% (65:35:10 v/v/v) as the mobile phase. Lipid samples were dissolved in chloroform and 20 µl were applied by micropipetting, and then visualized under ultraviolet light after spraying with 0.01% primulin in 90% aqueous acetone [36]. Differences in lipid content were quantified by densitometry of digital images from HPTLC plates acquired by GeneSnap Software for G:Box Chemi XL (Syngene, Cambridge, England) and quantified by Quantity One Software for Chemic Doc XRS (BioRad, Hercules, USA). The standard mixture contained 1 mg/ml each of five phospholipids (Sigma): phosphatidylinositol (PI), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylserine (PS). Toxins were also incubated with 10 µg of purified phospholipids: asymmetric PC or 16:0–18:0 PC (1-palmitoyl-2-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), and PAF *platelet-activating factor* or C16-2:0 PC (1-O-hexadecyl-2-acetoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine), and synthetic alkyl-phospholipids such as lysoPC or 16:0 Lyso PC (1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine) and lysoPAF or C16 Lyso PAF (1-O-hexadecyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine). Purified egg chicken sphingomyelin (egg SM) and other phospholipids tested were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, USA).

### 2.16. Statistical analysis

Statistical analysis of phospholipase activity and choline release data were performed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for average comparisons GraphPad InStat program version 3.00 for Windows. Mean ± SEM. values were used. Significance was determined as  $p \leq 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Cloning and expression of a mutated dermonecrotic toxin from LiRecDT1: drastic decrease of phospholipase-D activity by a single amino acid mutation

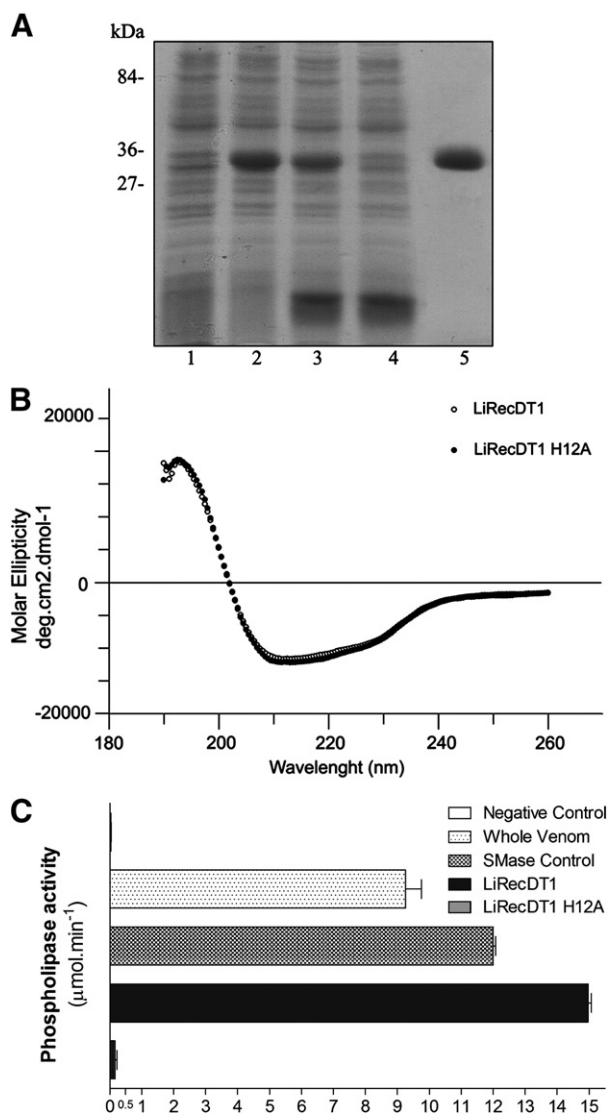
In order to obtain a mutated form of *L. intermedia* dermonecrotic toxin, an adapted “Megaprimer” PCR approach for site-specific mutation was used to clone a mutated dermonecrotic toxin based on the LiRecDT1 (GenBank accession number ABA62021) amino acid sequence [12]. This recombinant toxin contained an amino acid sequence that was substituted with alanine at the first histidine residue (His12), which plays a role in the catalytic reaction. Alteration of the active site was confirmed by sequencing analysis, and the resulting LiRecDT1 H12A mutated recombinant toxin was successfully expressed in the pET-14b system and purified in soluble form by Ni<sup>2+</sup>-NTA affinity chromatography (Fig. 1A). To insure the correct folding of the mutated toxin occurred despite the changed nucleotide sequence, which codes for a different protein sequence, conformational circular dichroism spectra measurements were performed. Indeed, we observed a secondary structure spectrum for the mutated form that was very similar to the LiRecDT1 CD profile as depicted in Fig. 1B. To investigate the enzymatic behavior of the mutated LiRecDT1 H12A phospholipase-D toxin *in vitro*, a fluorometric assay using sphingomyelin as the reaction substrate was performed (see Materials and methods section for details). LiRecDT1 and whole venom showed the expected high phospholipase-D activity [12], but the mutated toxin had almost no sphingomyelin hydrolysis activity under the same conditions. Fig. 1C shows that the activity of 10 µg of recombinant original toxin was about 85-fold higher than that of the mutated toxin.

#### 3.2. LiRecDT1 H12A did not induce dermonecrosis in rabbit skin and caused only a small inflammatory reaction

Dermonecrotic macroscopic development was observed in rabbit skin after 4 h and 8 h of exposure to 10 µg of whole venom (as a positive control) and original recombinant dermonecrotic toxin. However, treatment with the mutated form did not cause obvious dermonecrotic development, and the reaction was similar to the negative control (see Experimental). In addition, no edema or erythema was observed at the injection site in response to the mutated form (Fig. 2A). Light microscopic analysis of rabbit skin biopsies after 24 h of toxin treatment (Fig. 2B) demonstrated typical intense inflammatory cell accumulation and collagen fiber disorganization in the dermis with LiRecDT1 treatment. However, biopsy analysis of LiRecDT1 H12A exposed skin demonstrated a less intense inflammatory response. The neutrophil migration into the dermis was indirectly determined by means of MPO activity of tissue biopsies (Fig. 2C), and the differences in these values correlate with the microscopic analysis of inflammatory reaction.

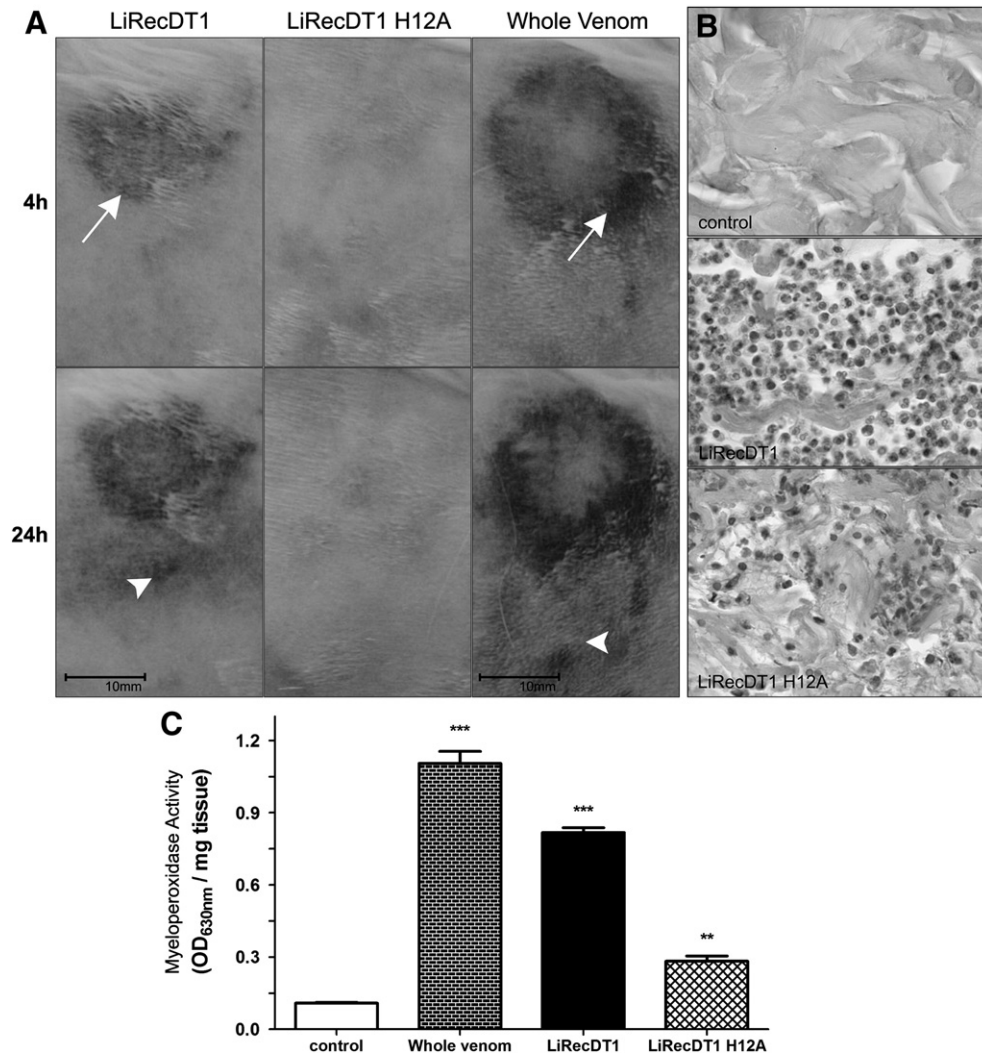
#### 3.3. The residual activity of LiRecDT1 H12A is concentration-dependent

As the microscopic analysis revealed an inflammatory reaction in rabbit skin treated with mutated recombinant toxin, it is possible that very low phospholipase-D activity persists despite modification of His12A in the catalytic site. This residual activity could be responsible for the observed biological effects. For this reason, phospholipase-D activity and dermonecrosis analysis of LiRecDT1 H12A were examined again at much higher concentrations. Higher amounts of LiRecDT1 H12A (100 µg, 250 µg, and 500 µg) were used in both experiments with the previously described conditions (Fig. 3). A 2.4-fold increase in phospholipase activity was observed between 100 and 500 µg protein. The phospholipase-D activity of the highest concentration tested (500 µg) compared to 10 µg of original recombinant toxin was



**Fig. 1.** Expression of a functional recombinant site-directed mutated dermonecrotic protein (LiRecDT1 H12A). (A) SDS-PAGE analysis of recombinant dermonecrotic toxin expression stained with Coomassie blue dye (12.5% gel under reducing conditions). Lanes 1 and 2 show *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells collected by centrifugation and resuspended in gel loading buffer before and 3.5 h after induction with 0.05 mM IPTG, respectively. Lanes 3 and 4 depict the supernatant of cell lysates obtained by freeze thawing in extraction buffer before and after (void) incubation with Ni-NTA agarose beads, respectively. Lane 5 shows eluted recombinant protein. Molecular masses are shown on the left. (B) Circular dichroism spectra for the purified recombinant original and mutated toxins. Spectra were obtained using toxins in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, at 25 °C. Molar ellipticity was analyzed in a wavelength range between 180 and 260 nm. (C) Phospholipase-D activity of recombinant toxins. Sphingomyelinase activities of LiRecDT1, LiRecDT1 H12A recombinant toxins, and whole venom were evaluated with the Amplex Red Assay Kit at 37 °C for 1 h; the product of the reaction was spectrofluorimetrically measured at 560 nm excitation and 590 nm emission wavelengths. A purified recombinant toxin without dermonecrotic and inflammatory activities was used as a negative control. Reactions were performed with 10 µg of whole venom or recombinant toxins (*n* = 6). Values given are the average ± SEM.

still 7-fold less intense (Figs. 1C and 3A). Moreover, Fig. 3B depicts *in vivo* experiments showing formation of edema and erythema at the injection site that were much less intense compared to those observed with LiRecDT1 after 4 h. At 24 h post LiRecDT1 H12A exposure, rabbit skin showed more edema, and an initial white eschar, known as a marble plate in loxoscelism (that commonly evolves into necrotic lesion) could be seen. Microscopic analyses (Fig. 3C) of biopsies from



**Fig. 2.** Dermonecrosis and inflammatory response of rabbit skin exposed to recombinant toxins. (A) Macroscopic visualization of dermonecrosis of rabbits intradermally injected with 10  $\mu$ g of whole venom (as positive control) or both recombinant toxins. Lesions were observed 4 and 24 h following venom and recombinant toxin injections. Arrows point to development of gravitational spreading of necrotic lesion post LiRecDT1 and whole venom injections. The scale bar is shown on the left. (B) Histopathological findings for rabbit skin were performed 24 h after recombinant toxin exposure. Light microscopic analysis of tissue sections were assessed by staining with hematoxylin and eosin (H&E). An intense inflammatory response with the presence of neutrophils and disorganization of collagen fibers in connective tissue is shown for the original toxin compared to a lower inflammatory reaction observed following mutated recombinant dermonecrotic toxin exposure. A recombinant toxin without phospholipase-D activity but obtained under identical conditions was used as a negative control (magnification 630 $\times$ ). (C) Inflammatory reactions induced by toxins and controls were estimated by measurement of myeloperoxidase activity from neutrophil infiltrate at the dermis. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM of absorbance at 630 nm. Each bar represents the mean of fifteen replicates (five from each of three tissue samples) of inoculation site at rabbit skin post 24 h. The asterisk denotes the significance levels when compared with negative control (\*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

rabbit skin treated with LiRecDT1 H12A at the higher concentrations showed an abundant neutrophil perivascular infiltrate and collapse of blood vessel walls into the dermis.

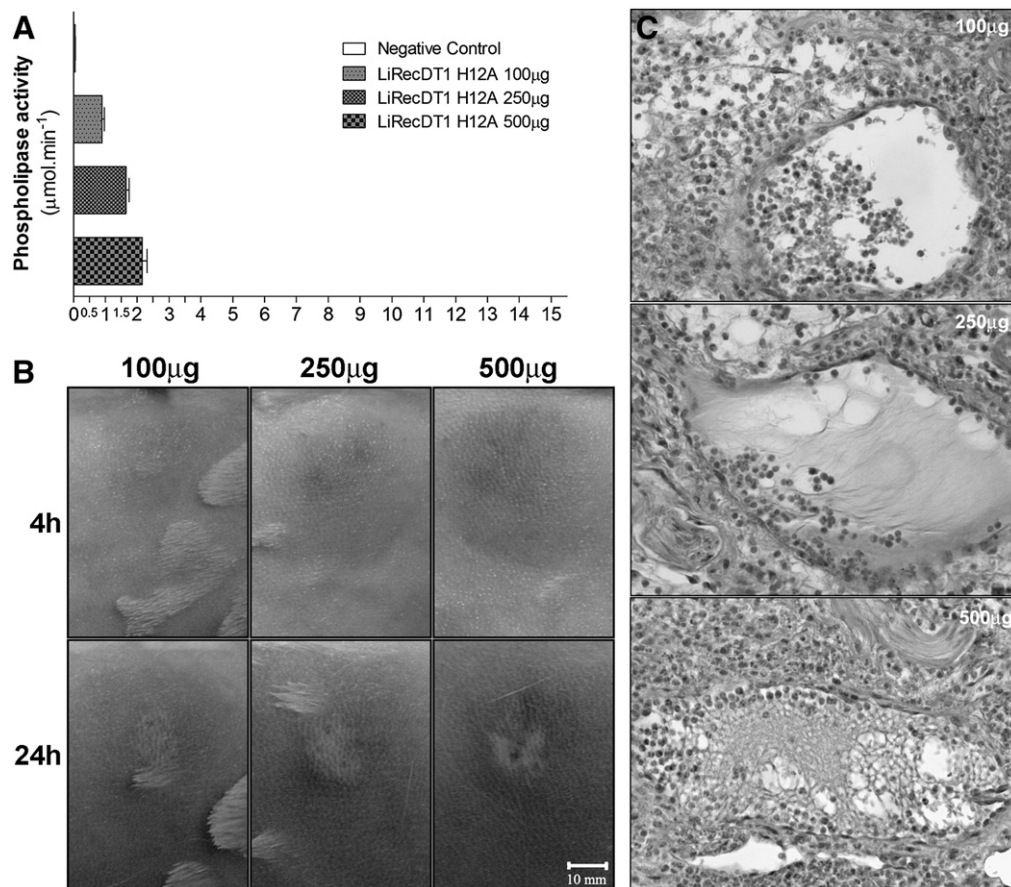
#### 3.4. Immunological cross-reactivity of original and mutated LiRecDTs

In order to determine whether antigens of our antibodies are conserved in the recombinant LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A, we produced polyclonal antisera against whole venom and LiRecDT1. Whole venom served as the positive control for native phospholipase-D toxins, which were also recognized by both antisera. Experiments were performed by Western blot (antibodies recognize epitopes on denatured antigens) and ELISA (antibodies recognize non-denatured epitopes on antigens). The cross-immunoreaction of antisera for both recombinant toxins showed that site-directed mutation did not alter immunological recognition by polyclonal antibodies; therefore, these antibodies can be used for further experiments (Fig. 4).

#### 3.5. Binding of both recombinant toxins to immobilized lipids in an overlapping assay

Fat blot assays are used for the identification of proteins possessing lipid recognition domains and for analysis of their lipid-binding specificities. Several different toxin interactions were detected via the protein–lipid overlay assay with a standard Western blot. These interactions have been shown to be involved in physiological and pathological processes including signal transduction mediated by GPCRs and induction of apoptosis [18–20,37,38]. With the goal of determining whether dermonecrotic toxin possesses some lipid affinity, we exposed the original and mutated isoform to immobilized lipids (Fig. 5). Additionally, we tested whole venom as a control to test native dermonecrotic toxins. Both recombinant isoforms bound to the same molecules: sphingomyelin and sphingosine 1-phosphate, phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine, and cholesterol. As a negative control, the membrane containing immobilized lipids was exposed to antibodies in the absence of toxins (data not shown).





**Fig. 3.** Residual phospholipase-D and inflammatory activities of LiRecDT1 H12A. (A) Mutated recombinant toxin was tested for persistent sphingomyelinase activity with increasing doses of 100, 250, and 500  $\mu\text{g}$ . Then, the Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit assay was performed using the same conditions and incubating at 37 °C for 1 h. Reactions were measured in a spectrofluorometer (wavelengths of 560 nm for excitation and 590 nm for emission). As a negative control, 10  $\mu\text{g}$  of enzymatic non-related recombinant toxin was also tested to assess background fluorescence. Increasing concentration-dependent phospholipase-D activity was observed ( $n=6$ ). Values given are the average  $\pm$  SEM. (B) Macroscopic analysis of rabbit skin exposed to higher concentrations of LiRecDT1 H12A. In a dose-dependent reaction, we observed a punctate and transient erythema at the injection site 4 h post exposure to mutated toxin exposure (100, 250, and 500  $\mu\text{g}$ ). After 24 h, development of an ischemic halo surrounding the injection site indicates typical and initial formation of dermonecrosis described as a marble plate, and (C) microscopic analysis of tissue sections by H&E show a large inflammatory response with massive neutrophil diapedesis and fibrin deposition at disrupted blood vessels for all three concentrations tested (magnification 630 $\times$ ).

The H12A substitution in the catalytic domain did not alter LiRecDT1 binding-affinity to the lipids.

### 3.6. Recombinant dermonecrotic toxins bind to the RAEC cell surface as “planted antigens”

We next examined the cell membrane interaction of the dermonecrotic toxin phospholipase-D family specifically, as whole venom is a complex mixture of biochemically and biologically different toxins. To do this, we evaluated recombinant dermonecrotic toxin binding to the endothelial cell surface using hyperimmune IgGs against LiRecDT1 by confocal immunofluorescence analysis (Fig. 6). Cells treated with both recombinant toxins showed an intense positive reaction on the cell surface. Untreated cells (negative control) were treated to confirm that there was no non-specific binding of the hyperimmune antibodies. The interaction of toxins with RAEC cell membranes had a homogeneous distribution pattern. Again, LiRecDT1 H12A was also able to bind to the plasma membrane (an environment enriched in lipids) despite the mutation in the catalytic site.

### 3.7. Choline release from RAEC cell membrane extracts with LiRecDT1 treatment

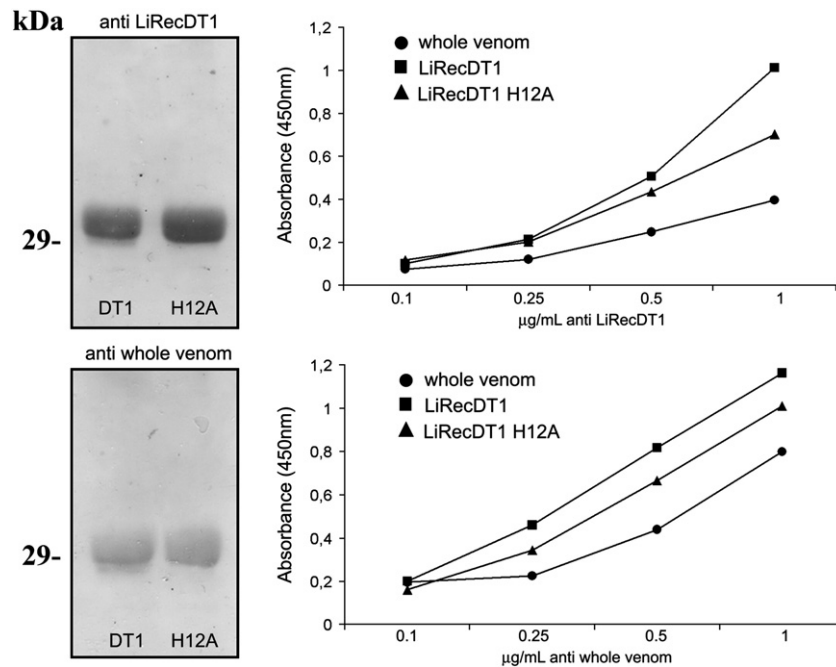
Since the appearance of cluster-like aggregates were observed on RAEC cell membranes only after LiRecDT1 but not mutated toxin treatment, we examined whether cell membrane RAEC extracts could

act as an enzymatic substrate for phospholipid hydrolysis. The original substrate used for the sphingomyelinase activity kit test (a purified sphingomyelin) was substituted with cell membrane detergent extract obtained from RAEC cells in culture (see [Materials and methods](#) for details). Therefore, not only sphingomyelin, but also other phospholipids from RAEC cell extracts could be the target of phospholipase-D. Incubation of recombinant toxins with extracts triggered significant formation of choline in response to LiRecDT1 in a concentration- and time-dependent manner (Fig. 7A). Changes in cell morphology triggered by LiRecDT1, such as cytoplasmic vacuolization and the presence of debris resulting from cell lysis were observed (Fig. 7B). These results suggested that phospholipase-D activity on membrane phospholipids correlates directly with cytotoxicity.

### 3.8. LiRecDT1 degrades lipids from RAEC cell membrane extracts and purified phospholipids

In addition to the phospholipase-D activity indirectly shown by choline release, hydrolysis of RAEC cell membrane extracts can be observed through high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). Fig. 8A and B shows that after incubation with both LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A, the intensity of primuline-positive bands decreased compared to non-treated extract control. With 50  $\mu\text{l}$  of extracts, the band for phosphatidylethanolamine was gradually reduced to a final relative quantity of 37% after 16 h with active phospholipase-D. However, the mutated isoform was able to degrade





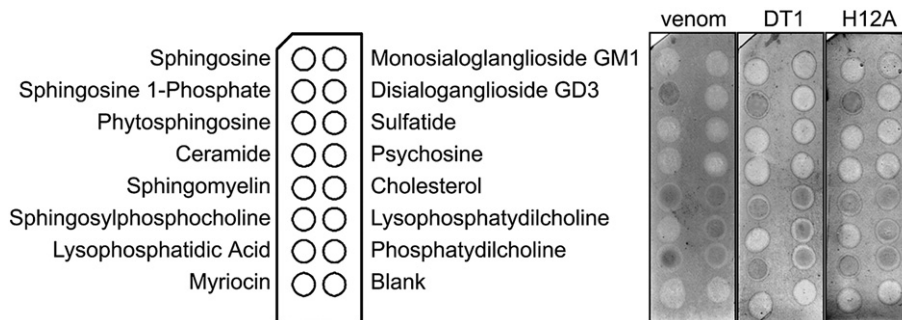
**Fig. 4.** Immunological cross-reactivity of the recombinant toxins LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A. Original (DT1) and mutated (H12A) toxins at a concentration of 10 µg were electrophoresed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes, and incubated with purified IgGs from sera recognizing whole venom or LiRecDT1. Immunoblotting was performed with secondary antibodies coupled to alkaline phosphatase and BCIP/NBT substrate. Additionally, antibody capture assays (ELISA) were carried out using whole venom and recombinant toxins LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A (10 µg/ml) immobilized on a solid phase. Again, purified antibodies against whole venom or LiRecDT1 (abscissa) were incubated for 2 h at room temperature and the immunoreaction was performed using secondary antibodies coupled to peroxidase and OPD substrate. Colorimetric measurement was performed by absorbance at 450 nm. Values given are average of pentuplicates.

only 5% of initial content. With two-fold greater volume (100 µl) of extracts but the same concentrations of recombinant toxins, bands for other lipids such as sphingomyelin and phosphatidylcholine are visible and show drastic intensity decreases. Specifically, SM was reduced to 5.6% and PC to 13.0% of the control. Interestingly, the mutated isoform of phospholipase-D was able to significantly degrade SM after 16 h to less than a half of initial content (41.1%), but the same was not observed for PC, which was only reduced to approximately 87.2% of control. The bands for phosphatidylserine were also reduced by both toxins, to 58.9% and 63.2% of control for LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A, respectively. Next, we tested purified phospholipids individually (Fig. 8C and D) and found that 3 h after incubation, egg sphingomyelin and lysoPC were most susceptible to hydrolysis by recombinant toxins from *L. intermedia* with a reduction to 6.2% and 4.9% of control, respectively. The H12A mutation did not completely abolish its enzymatic ability, as the mutated toxin hydrolyzed both phospholipids but with lower effectiveness (77.0% and 59.2%,

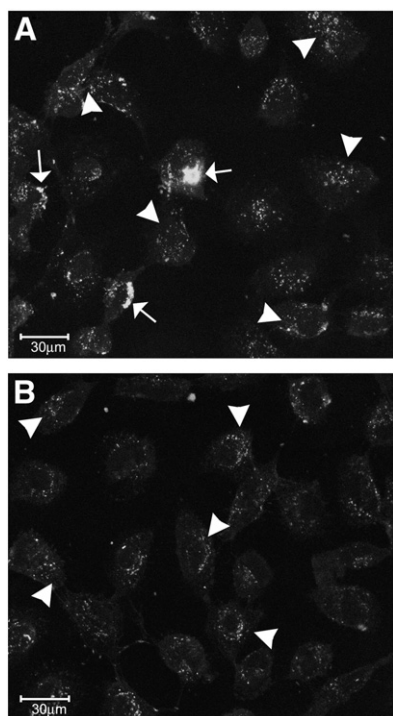
respectively). In addition, PC asymmetric, PAF and lysoPAF were also degraded by the toxins, but more significantly by the original than the mutated isoform. These results suggest that brown spider phospholipase-D has no specificity for one single type of lipid as a substrate/target. Lipid-derived products can be visualized at the top of those lanes with intense decrease of initial lipid content (\*). Purified sphingomyelin and lysophospholipids were the best substrates of this enzyme, but after only 3 h of incubation other non-lysophospholipids were also significantly degraded. These were also observed in HPTLC with cell membrane extracts.

#### 4. Discussion

Loxoscelism is characterized as a group of severe clinical symptoms triggered by brown spider (*Loxosceles* genus) bites. Brown spider bites can induce dermonecrotic lesions, hematological disorders, and renal failure [1,2]. Histopathological findings for rabbit skin experimentally



**Fig. 5.** Lipid binding of venom toxins in fat blot assays. Each spot contains 100 pmol of the indicated lipid in the layout of strips used to test the affinity of whole venom and recombinant toxins, which were incubated at a concentration of 0.5 µg/ml with the membranes. Samples of whole venom, LiRecDT1, and LiRecDT1 H12A show overlapping with the same spotted lipids: sphingosine 1-phosphate and sphingomyelin, lysophosphatidic acid, cholesterol, and both lysophosphatidylcholine and phosphatidylcholine. Lipid binding of the toxins was detected using purified IgGs against whole venom or against LiRecDT1, and revealed with secondary antibodies coupled to alkaline phosphatase and BCIP/NBT substrate.



**Fig. 6.** Recombinant dermonecrotic toxin binding to RAEC cell membranes. Confocal immunofluorescence microscopy analysis was performed for both LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A-treated endothelial cells incubated with antibodies anti-LiRecDT1 and a specific secondary fluorescent conjugate. (A) Four hours post-incubation of Original toxin (40 µg/ml), the cell surface showed punctate binding of LiRecDT1 (arrowheads) and deposition as aggregated clusters (arrows). (B) LiRecDT1 H12A treatment (40 µg/ml) also caused non-homogeneous binding of the mutated toxin (arrowheads), but no cell membrane aggregation was visualized. The scale bar is visualized on the left.

exposed to whole venom have shown the degeneration of blood vessel walls, endothelial cytotoxicity, and fibrin and thrombus formation [6,7]. Likewise, capillary hyperpermeability and intense infiltration of polymorphonuclear leukocytes around blood vessels cause a massive inflammatory response to the venom toxins [2,11].

Brown spider venom is a complex mixture of biochemically and biologically varied toxins reported by proteomic analysis to have molecular masses predominantly in the range of 3–40 kDa [39–41]. Most reported biological effects can be reproduced by dermonecrotic toxin family members (phospholipases-D). Previous reports have shown that a recombinant dermonecrotic toxin from the *L. intermedia* venom gland (LiRecDT1) was capable of stimulating dermonecrosis, hemolysis, platelet aggregation, renal disturbance, increased vascular permeability, and a deregulated inflammatory activation [11–13,15,41].

Futrell [2] has characterized dermonecrotic toxin as a sphingomyelinase-D enzyme because of its ability to hydrolyze sphingomyelin into choline and acylsphingosine phosphate. Recently, Lee and Lynch [10] suggested the term sphingomyelinase-D should be replaced by phospholipase-D to better classify brown spider dermonecrotic toxins based on their additional ability to hydrolyze glycerophospholipids. As such, the formation of lipid metabolites (also known as potent bioactive molecules) such as C1P or LPA could be responsible for the toxicity by activating signaling pathways related to a variety of pathophysiologic changes [10,18,20].

In this work, we investigated the dependence of the enzymatic activity of phospholipase-D to evoke the toxicity displayed in response to the biological effects of brown spider dermonecrotic toxin. To this end, we produced a mutated form of the dermonecrotic toxin from *L. intermedia* venom. The previously described LiRecDT1 was modified at the catalytic site with a single amino acid change using a site-directed mutagenesis strategy. In the literature, several studies have

used the mutation of specific amino acid residues to evaluate the structure and function of toxins [42,43]. Kukreja et al. [44] examined the molecular action of botulinum neurotoxin endopeptidase by substituting Glu262 with Asp and showed a 3-fold decrease in catalytic efficiency. This mutation did not induce any significant structural alterations in the active site and did not interfere with substrate binding.

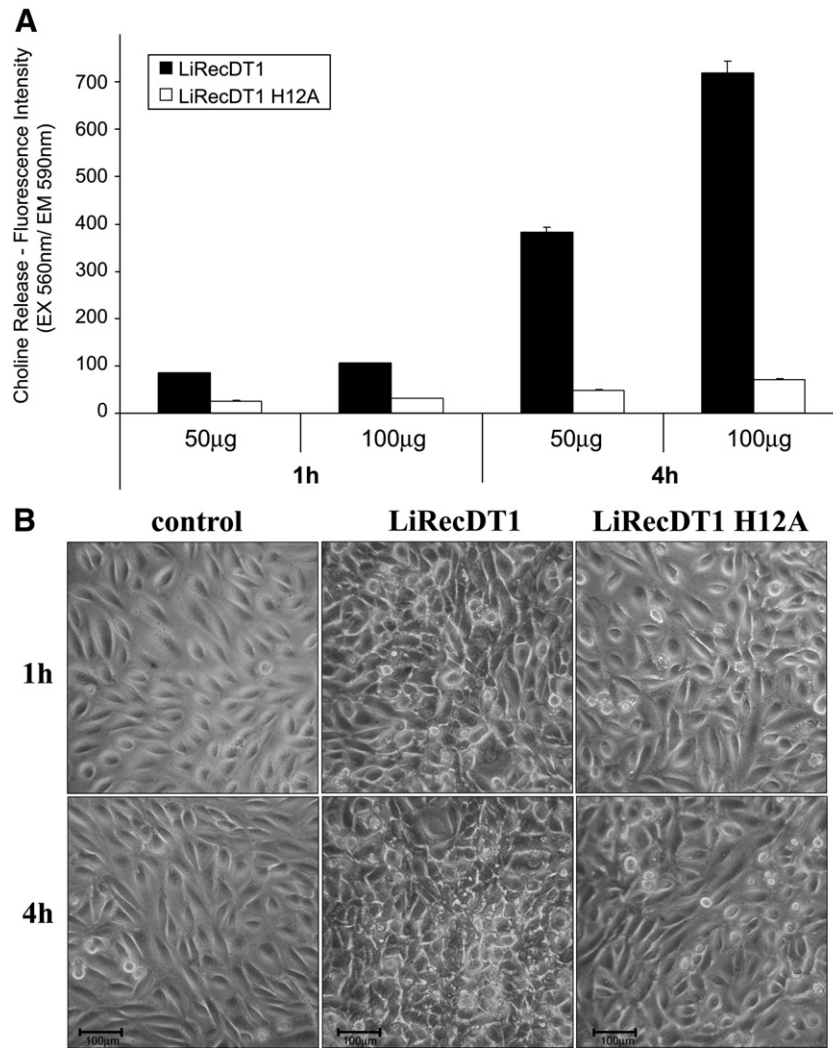
Based on a study of the crystal structure of *L. laeta* dermonecrotic toxin (SMaseI) [17], the proposed acid base catalytic mechanism postulated residues His12 and His47 as playing key roles and being supported by a network of hydrogen bonds between Asp34, Asp52, Trp230, Asp233, and Asn252. We chose the first histidine residue (His12) in the catalytic site as a mutation target, intending to abolish phospholipase-D activity of the resulting toxin.

Recombinant expression of the mutated toxin as a fusion protein was successfully achieved (Fig. 1A and B) and we named it LiRecDT1 H12A (*Loxosceles intermedia* dermonecrotic toxin 1, mutation at His12 to Ala residue). To confirm the effectiveness of the site-directed mutation in extinguishing phospholipase-D activity, we performed classic tests for characterizing dermonecrotic toxin: sphingomyelin hydrolysis *in vitro* and dermonecrosis *in vivo* [1,2]. Compared to 10 µg of the original toxin and whole venom, LiRecDT1 H12A presented insignificant phospholipase-D activity and no macroscopic effect on rabbit skin (Fig. 1C). Meanwhile, histopathological findings for the LiRecDT1 H12A tissue samples showed the presence of a neutrophil infiltrate and collagen fiber disorganization in the treated rabbit skin (Fig. 2B). Despite this controversial finding, we presume that LiRecDT1 H12A did not lose phospholipase-D activity completely. Indeed, residual enzymatic activity was observed by testing higher concentrations of the mutated toxin (Fig. 3). The phospholipase-D activity of 500 µg of the mutated toxin increased compared to 10, 50, and 100 µg, but was considerably lower than 10 µg of the original toxin, suggesting some residual catalytic activity of the protein.

Cross-reactivity experiments demonstrated that antibodies against venom or LiRecDT1 can also recognize linear (Fig. 4) and conformational epitopes (Fig. 4) of LiRecDT1 H12A. As a result, the mutated toxin could be used as a biological tool for comparing identical proteins with almost insignificant enzymatic activity that is a structural analogue for dermonecrotic toxin. First, anti-toxin hyper-immune IgGs were used to reveal the binding of LiRecDT1 to specific lipids immobilized in nitrocellulose (Fig. 5). Protein–lipid overlapping experiments are *in vitro* reproductions of biological events triggered by protein interactions with lipid domains on the plasma cell membrane. Recombinant original and mutated toxins bound to the same lipids, including sphingomyelin and phosphatidylcholine.

The His12Ala modification in the amino acid sequence of recombinant dermonecrotic toxin did not interfere with its lipid-binding property. LiRecDT1 may be interacting by a linear or conformational region in the molecule independently of catalytic activity or even the active site domain. It has been well described that proteins expose hydrophobic surfaces of their molecular structures, allowing them to bind phospholipids on the cell membrane and trigger various biological effects [45,46]. LiRecDT1 contains 42.6% hydrophobic residues in its amino acid sequence. Several short sequences show conserved hydrophobicity in LiRecDT1 (AILMFPWYV) and *L. laeta* SMase I (AY093599) based on amino acid sequence alignment. Structural analysis of recombinant dermonecrotic toxin from SMase I [16,17] has shown that hydrophobic loops participate in the interfacial region of the enzyme where the active site is located in a shallow cleft.

Hydrophobic domains in the secondary and tertiary structure of brown spider dermonecrotic toxin probably play a role in its ability to bind lipids on the cell membrane independent of enzymatic activity but not necessarily unrelated to the active site of LiRecDT1. Metal-coordination and charged residues in the catalytic domain must be important for targeting phospholipids in a hydrophilic environment



**Fig. 7.** Choline release induced by recombinant toxins from hydrolysis of membrane extracts as well as cytotoxic effects on endothelial cell cultures. (A) Detergent-extracts of RAEC cell membranes (100 µl) were incubated with LiRecDT1 or LiRecDT1 H12A (abscissa depicts both toxins used at concentrations of 50 µg or 100 µg) for 1 h and 4 h in a 37 °C water bath. Choline formation was detected using a reaction mixture adapted from the Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (see [Materials and methods](#)). Degradation of cell membrane extracts by toxins results in indirect detection of a fluorescent product that was measured in a spectrofluorometer using an excitation at 560 nm with emission detection at 590 nm. (B) Using inverted light microscopy, morphological changes in RAEC cells were observed following incubation of recombinant toxins (10 µg/ml) and images were captured at 1 h and 4 h after exposure. First, LiRecDT1 triggered vacuolization of the cell cytoplasm, which is accompanied by cell lysis and alteration of cellular adhesion to other neighboring cells and substrate. Despite this, LiRecDT1 H12A does not seem to induce a significant change in treated-cells. Control cells, which received adequate amounts of vehicle (PBS) instead of recombinant toxins, displayed typical RAEC cell morphology throughout the experimental procedure.

and are indispensable for hydrolysis of membrane lipids. For example, a prediction for the interaction of alpha-toxin (a phospholipase C from *Clostridium perfringens*) with cell membranes has revealed two different domains: calcium mediated recognition of phospholipids head groups at the active site (amino-terminal region) and interaction of hydrophobic amino acids with the phospholipid tail group. These domains are structurally similar to phospholipid-binding domains in eukaryotic proteins (carboxy-terminal region) [47].

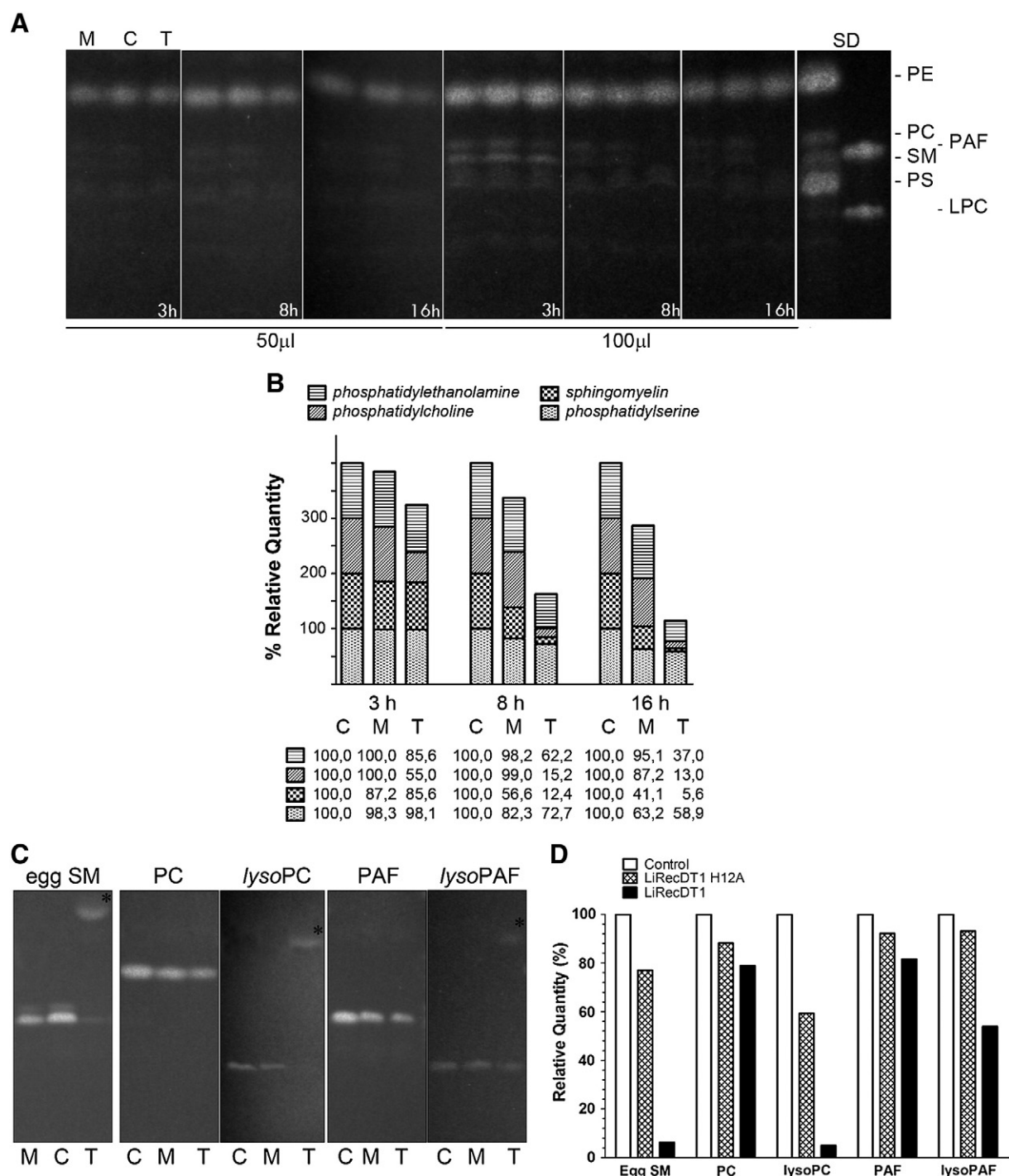
Structure function analysis of LiRecDT1 H12A supports this hypothesis because the same lipid affinity was observed via the fat blot assay despite almost insignificant enzymatic activity. The binding of both toxins was also maintained as demonstrated in treated RAEC cells (as “planted antigens”) and immunofluorescence experiments. Recently, in biological approaches with recombinant toxin treated mice, Kusma et al. [28] showed that a mutated isoform binds to intrinsic renal structures as well as the LiRecDT1.

The anti-toxin antibody assays showed the same non-homogeneous pattern for the interaction of both toxins with the RAEC cell surface (Fig. 6). Both recombinant toxins seem to be aggregated throughout the RAEC surface, binding to specific microdomains in the cell membrane. A

number of toxins such as bacterial and viral pathogens are able to exploit cholesterol and/or lipid rafts to gain a “foot hold” on their target hosts [48]. Leukotoxin (Ltx) is a bacterial protein toxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* that induces  $Ca^{2+}$  fluxes, mobilizing clusters of LFA-1 (surface antigen of innate and adaptive immune cells) to lipid rafts. Ltx utilizes the raft to stimulate an integrin signaling pathway that results in target cell responses that mimic ‘outside-in’ activation signals, leading to apoptosis of target cells [49] but no change in lipid raft content.

Moreover, direct cytotoxicity was observed after LiRecDT1 exposure by changes in morphology of RAEC cell cultures (Fig. 7A). Vacuolization of the cytoplasm, cell lysis debris, and alteration of cell–cell and cell–substrate adhesion were induced in a time-dependent manner by LiRecDT1 toxin treatment. The response of RAEC cells to LiRecDT1 H12A was very similar to untreated cells (negative control). The direct cell membrane interaction with dermonecrotic toxins does not presuppose cytotoxic effects, as this only occurs when significant enzymatic activity is present. Likewise, morphological changes in MDCK cells and proteinuria and renal tissue damage in mice were only triggered by recombinant phospholipase-D with intact enzymatic activity [28].





**Fig. 8.** HPTLC analysis of hydrolysis of RAEC cell membrane extracts and purified phospholipids by recombinant toxins. Triton X-100 extracts from endothelial cell cultures were incubated with 50 µg of either LiRecDT1 (T) or its mutated isoform, LiRecDT1 H12A (M), and non-treated extracts were used as control (C), for 3, 8, and 16 h. (A) Recovered lipids post-butanol extraction were visualized by primuline reagent in HPTLC plates, as described in [Materials and methods](#). (C) After 3 h of incubation with toxins, purified lipids were also submitted to HPLC; egg chicken sphingomyelin (egg SM), asymmetric phosphatidylcholine C16:0–18:0 (PC), lysophosphatidylcholine (lysoPC), C16–2:0 PC (PAF), C16 Lyso PAF (lysoPAF). (B and D) Band intensities were estimated densitometrically and were plotted as percentage of relative quantity, comparing with respective control samples (100%). Percentage values are shown in the table (B), HPTLC bands of cell extracts lipid content were compared with migration patterns of phospholipids in the standard mixture (PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, SM: sphingomyelin, PS: phosphatidylserine).

Phospholipase-D hydrolysis of the phosphodiester bond of glycerophospholipids generates (lyso)phosphatidic acid, and the degradation of sphingolipids forms ceramide. This reaction frees a headgroup, such as choline (resulting, for example, from sphingomyelin and (lyso)phosphatidylcholine [10,50]), which can act as a substrate for brown spider phospholipase-D. Choline release assays demonstrated direct hydrolysis of membrane extracts in a time- and

concentration-dependent manner only with LiRecDT1 treatment (Fig. 8B), supporting the idea of catalytic-dependent cytotoxicity and suggesting that products of phospholipases-D degradation induce formation of bioactive mediators such as C1P or LPA [22,23].

In Fig. 8 (see \*), the formation of subproducts induced by hydrolysis can be observed in HPTLC images, mainly in the top of those lanes where samples were exposed to active phospholipase-D and original lipid

content was almost degraded. Many lipids or lipid-derived products generated by phospholipases acting on phospholipids in membranes are implicated as mediators and second messengers in signal transduction [51]. For example, autotaxin (ATX) is an *exo*-enzyme originally identified as a tumor cell autocrine and paracrine motility factor. ATX is a multifunctional phosphodiesterase that primarily acts as a lysophospholipase D [52,53], converting lysophosphatidylcholine into LPA. LPA mediates multiple biological functions, including the cytoskeletal reorganization and chemotaxis observed in melanoma cells. Likewise, endothelial cell plasma membranes could be targeted by phospholipase-D activity, for which the regulation of lipid-derived second messenger levels intra- and intercellularly is not well understood [54]. Morphological alterations induced by phospholipase-D activity in RAEC cells could be explained by this hypothesis (Fig. 8B). Furthermore, the hallmark of brown spider dermonecrotic toxins is both dermonecrosis and hydrolysis of sphingomyelin, which in tissue context has been shown to be related to an inflammatory overreaction. This event is triggered by intense neutrophil migration, which is dependent on the activation of fibroblast and endothelial cells by generating lipid mediators (such as C1P, an interconvertible molecule [22]) that cause a cascade of signaling events as pro-inflammatory cytokines upregulation and leukocytes recruitment [25].

As expected, LiRecDT1 and recombinant toxins obtained from *Loxosceles* genus venom glands have the ability to hydrolyze sphingomyelin and lysophospholipids [10,55]. Interestingly, *L. intermedia* toxins also hydrolyze phospholipids such as phosphatidylcholine or PAF (platelet-activating factor), which are non alkyl-phospholipids (Fig. 8). The resulting lipid metabolite is phosphatic acid (PA), another bioactive metabolite related to LPA that has already been reported to play a role in stimulating several signaling pathways [56]. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process, which are critical in cell–cell interactions in inflammatory and thrombotic responses of endothelial cells [54,57,58]. In the same way, hemostatic disturbances such as blood coagulation problems have been reported in with some brown spider bites [59]. In addition, platelet hyperaggregation was experimentally observed in human blood platelets exposed to a dermonecrotic toxin from *L. reclusa* [60] and also thrombus formation and hemorrhage in rabbits tested with *L. gaucho* venom [61]. All phospholipids tested as substrates in HPTLC analysis with LiRecDT1 are important components/targets of plasma membranes of erythrocytes and platelets, for which phospholipase-D activity could be triggering several well known biological effects in brown spider accidents.

## 5. Conclusion

We present experimental data and literature supporting the direct involvement of dermonecrotic toxin in the biological effects evoked by brown spider venom. These data demonstrate phospholipase-D enzymatic activity on the endothelial cell membrane, suggesting a non-specific formation of different lipid mediators from cell membrane phospholipids. Our results bring new insights to the pathologic processes associated with a lipid role in pathways of the inflammatory response and dermonecrosis in *Loxoscelism*.

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, FAPESP, CNPq and CAPES, Brazil.

## References

- [1] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M.H. Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709.
- [2] J.M. Futrell, *Loxoscelism*, *Am. J. Med. Sci.* 304 (1992) 261–267.
- [3] E. Kalapothakis, M. Chatzaki, H. Goncalves-Dornelas, C.S. de Castro, F.G. Silvestre, F.V. Laborne, J.F. de Moura, S.S. Veiga, C. Chavez-Olortegui, C. Granier, K.C. Barbaro, The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom, *Toxicon* 50 (2007) 938–946.
- [4] D.L. Swanson, R.S. Vetter, *Loxoscelism*, *Clin. Dermatol.* 24 (2006) 213–221.
- [5] M.H. Appel, R.B. da Silveira, W. Gremski, S.S. Veiga, Insights into brown spider and loxoscelism, *Invertebr. Surviv. J.* 2 (2005) 152–158.
- [6] S.S. Veiga, V.C. Zanetti, C.R. Franco, E.S. Trindade, M.A. Porcionatto, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, In vivo and in vitro cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells, *Thromb. Res.* 102 (2001) 229–237.
- [7] V.C. Zanetti, R.B. da Silveira, J.L. Dreyfuss, J. Haoach, O.C. Mangili, S.S. Veiga, W. Gremski, Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13 (2002) 135–148.
- [8] K.S. Paludo, L.H. Gremski, S.S. Veiga, O.M. Chaim, W. Gremski, D. de Freitas Buchi, H.B. Nader, C.P. Dietrich, C.R. Franco, The effect of brown spider venom on endothelial cell morphology and adhesive structures, *Toxicon* 47 (2006) 844–853.
- [9] A. Senff-Ribeiro, P. Henrique da Silva, O.M. Chaim, L.H. Gremski, K.S. Paludo, R. Bertoni da Silveira, W. Gremski, O.C. Mangili, S.S. Veiga, Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 210–218.
- [10] S. Lee, K.R. Lynch, Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA), *Biochem. J.* 391 (2005) 317–323.
- [11] M.H. Appel, R.B. da Silveira, O.M. Chaim, K.S. Paludo, D.T. Silva, D.M. Chaves, P.H. da Silva, O.C. Mangili, A. Senff-Ribeiro, W. Gremski, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 167–178.
- [12] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chavez-Olortegui, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. von Dietrich, H.B. Nader, S. Sanches Veiga, Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (2006) 64–77.
- [13] R.B. da Silveira, O.M. Chaim, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases, *Toxicon* 49 (2007) 758–768.
- [14] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, J.L. Dreyfuss, L. Toma, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, W. Gremski, Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization, *Biochimie* 89 (2007) 289–300.
- [15] R.O. Ribeiro, O.M. Chaim, R.B. da Silveira, L.H. Gremski, Y.B. Sade, K.S. Paludo, A. Senff-Ribeiro, J. de Moura, C. Chavez-Olortegui, W. Gremski, H.B. Nader, S.S. Veiga, Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Toxicon* 50 (2007) 1162–1174.
- [16] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, S.A. de Andrade, A. Gabdoulkhakov, C. Betzel, D.V. Tambourgi, R.K. Arni, Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342 (2006) 323–329.
- [17] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, D.V. Tambourgi, R.K. Arni, Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13658–13664.
- [18] B. Anliker, J. Chun, Lysophospholipid G protein-coupled receptors, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20555–20558.
- [19] Y.A. Hannun, The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3125–3128.
- [20] W.H. Moolenaar, L.A. van Meeteren, B.N. Giepmans, The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling, *Bioessays* 26 (2004) 870–881.
- [21] B.J. Pettus, A. Bielawska, S. Spiegel, P. Roddy, Y.A. Hannun, C.E. Chalfant, Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 38206–38213.
- [22] C.E. Chalfant, S. Spiegel, Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4605–4612.
- [23] M.C. van Dijk, F. Postma, H. Hilkmann, K. Jalink, W.J. van Blitterswijk, W.H. Moolenaar, Exogenous phospholipase D generates lysophosphatidic acid and activates Ras, Rho and Ca<sup>2+</sup> signaling pathways, *Curr. Biol.* 8 (1998) 386–392.
- [24] L.A. van Meeteren, F. Frederiks, B.N. Giepmans, M.F. Pedrosa, S.J. Billington, B.H. Jost, D.V. Tambourgi, W.H. Moolenaar, Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10833–10836.
- [25] B. Dragulev, Y. Bao, B. Ramos-Cerrillo, H. Vazquez, A. Olvera, R. Stock, A. Algaron, J.W. Fox, Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: insights into spider venom dermonecrosis, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1264–1266.
- [26] L. Chioato, R.J. Ward, Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A2 by sequence analysis and site directed mutagenesis, *Toxicon* 42 (2003) 869–883.
- [27] H. Sakamoto, J. Bellalou, P. Sebo, D. Ladant, Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 13598–13602.
- [28] J. Kusma, O.M. Chaim, A.C. Wille, V.P. Ferrer, Y.B. Sade, L. Donatti, W. Gremski, O.C. Mangili, S.S. Veiga, Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity, *Biochimie* 90 (2008) 1722–1736.
- [29] D. Chaves-Moreira, O.M. Chaim, Y.B. Sade, K.S. Paludo, L.H. Gremski, L. Donatti, J. de Moura, O.C. Mangili, W. Gremski, R.B. da Silveira, A. Senff-Ribeiro, S.S. Veiga, Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity

- induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom, *J. Cell. Biochem.* 107 (2009) 655–666.
- [30] L. Feitosa, W. Gremski, S.S. Veiga, M.C. Elias, E. Graner, O.C. Mangili, R.R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Toxicon* 36 (1998) 1039–1051.
- [31] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- [32] R.B. da Silveira, A.C. Wille, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, C.R. Franco, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Biochem. J.* 406 (2007) 355–363.
- [33] P.P. Bradley, D.A. Priebe, R.D. Christensen, G. Rothstein, Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol.* 78 (1982) 206–209.
- [34] J.C. Castardo, A.S. Prudente, J. Ferreira, C.L. Guimarães, F.D. Monache, V.C. Filho, M.F. Otuki, D.A. Cabrini, Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema, *J. Ethnopharmacol.* 118 (2008) 405–411.
- [35] E. Harlow, D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- [36] K.A. Yoneyama, A.K. Tanaka, T.G. Silveira, H.K. Takahashi, A.H. Straus, Characterization of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 2171–2178.
- [37] D. He, V. Natarajan, R. Stern, I.A. Gorshkova, J. Solway, E.W. Spannake, Y. Zhao, Lysophosphatidic acid-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> release via C/EBPβ in human bronchial epithelial cells, *Biochem. J.* 412 (2008) 153–162.
- [38] C. Luquain, V.A. Sciorra, A.J. Morris, Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 377–383.
- [39] C.S. de Castro, F.G. Silvestre, S.C. Araujo, M.Y. Gabriel de, O.C. Mangili, I. Cruz, C. Chavez-Olortegui, E. Kalapothakis, Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*, *Toxicon* 44 (2004) 273–280.
- [40] L.F. Machado, S. Laugesen, E.D. Botelho, C.A. Ricart, W. Fontes, K.C. Barbaro, P. Roepstorff, M.V. Sousa, Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnegrocin isoforms in *Loxosceles gaucha* venom, *Proteomics* 5 (2005) 2167–2176.
- [41] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, O.C. Mangili, W. Gremski, C.P. Dietrich, H.B. Nader, S.S. Veiga, Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland, *Biochimie* 88 (2006) 1241–1253.
- [42] M. Miyamoto, N. Onozato, D. Selvakumar, T. Kimura, Y. Furuichi, T. Komiyama, The role of the histidine-35 residue in the cytotoxic action of HM-1 killer toxin, *Microbiology* 152 (2006) 2951–2958.
- [43] B. Promdonkoy, D.J. Ellar, Structure–function relationships of a membrane pore forming toxin revealed by reversion mutagenesis, *Mol. Membr. Biol.* 22 (2005) 327–337.
- [44] R.V. Kukreja, S. Sharma, S. Cai, B.R. Singh, Role of two active site Glu residues in the molecular action of botulinum neurotoxin endopeptidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1774 (2007) 213–222.
- [45] A. Mulgrew-Nesbitt, K. Diraviyam, J. Wang, S. Singh, P. Murray, Z. Li, L. Rogers, N. Mirkovic, D. Murray, The role of electrostatics in protein–membrane interactions, *Biochim. Biophys. Acta* 1761 (2006) 812–826.
- [46] J.L. Pellequer, A.J. Gale, E.D. Getzoff, Blood coagulation: the outstanding hydrophobic residues, *Curr. Biol.* 10 (2000) R237–R240.
- [47] R.W. Titball, C.E. Naylor, J. Miller, D.S. Moss, A.K. Basak, Opening of the active site of *Clostridium perfringens* alpha-toxin may be triggered by membrane binding, *Int. J. Med. Microbiol.* 290 (2000) 357–361.
- [48] D.J. Hawkes, J. Mak, Lipid membrane; a novel target for viral and bacterial pathogens, *Curr. Drug Targets* 7 (2006) 1615–1621.
- [49] K.P. Fong, C.M. Pacheco, L.L. Otis, S. Baranwal, I.R. Kieba, G. Harrison, E.V. Hersh, K. Boesze-Battaglia, E.T. Lally, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity, *Cell. Microbiol.* 8 (2006) 1753–1767.
- [50] M. McDermott, M.J. Wakelam, A.J. Morris, Phospholipase D, *Biochem. Cell Biol.* 82 (2004) 225–253.
- [51] E.A. Dennis, S.G. Rhee, M.M. Billah, Y.A. Hannun, Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction, *FASEB J.* 5 (1991) 2068–2077.
- [52] M. Umez-Goto, Y. Kishi, A. Taira, K. Hama, N. Dohmae, K. Takio, T. Yamori, G.B. Mills, K. Inoue, J. Aoki, H. Arai, Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production, *J. Cell Biol.* 158 (2002) 227–233.
- [53] L.A. van Meeteren, W.H. Moolenaar, Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis, *Prog. Lipid Res.* 46 (2007) 145–160.
- [54] R.E. Whatley, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, Lipid metabolism and signal transduction in endothelial cells, *Prog. Lipid Res.* 29 (1990) 45–63.
- [55] S.A. de Andrade, M.T. Murakami, D.P. Cavalcante, R.K. Arni, D.V. Tambourgi, Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom, *Toxicon* 47 (2006) 380–386.
- [56] X. Wang, S.P. Devaiah, W. Zhang, R. Welti, Signaling functions of phosphatidic acid, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 250–278.
- [57] L. Ostrovsky, A.J. King, S. Bond, D. Mitchell, D.E. Lorant, G.A. Zimmerman, R. Larsen, X.F. Niu, P. Kubes, A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process, *Blood* 91 (1998) 3028–3036.
- [58] S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, D.M. Stafforini, T.M. McIntyre, Platelet-activating factor and related lipid mediators, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 419–445.
- [59] R.S. Rees, C. Gates, S. Timmons, R.M. Des Prez, L.E. King Jr., Plasma components are required for platelet activation by the toxin of *Loxosceles reclusa*, *Toxicon* 26 (1988) 1035–1045.
- [60] G. Kurpiewski, L.J. Forrester, J.T. Barrett, B.J. Campbell, Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*, *Biochim. Biophys. Acta* 678 (1981) 467–476.
- [61] F.L. Tavares, M.C. Sousa-e-Silva, M.L. Santoro, K.C. Barbaro, I.M. Rebecchi, I.S. Sano-Martins, Changes in hematological, hemostatic and biochemical parameters induced experimentally in rabbits by *Loxosceles gaucha* spider venom, *Hum. Exp. Toxicol.* 23 (2004) 477–486.

Review

## Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes

Olga Meiri Chaim<sup>1</sup>, Dilza Trevisan-Silva<sup>1</sup>, Daniele Chaves-Moreira<sup>1</sup>, Ana Carolina M. Wille<sup>1,2</sup>, Valéria Pereira Ferrer<sup>1</sup>, Fernando Hitomi Matsubara<sup>1</sup>, Oldemir Carlos Mangili<sup>3</sup>, Rafael Bertoni da Silveira<sup>2</sup>, Luiza Helena Gremski<sup>1</sup>, Waldemiro Gremski<sup>1,4</sup>, Andrea Senff-Ribeiro<sup>1</sup> and Silvio Sanches Veiga<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, CEP 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil; E-Mails: olgachaim@ufpr.br (O.M.C.); dilzatrevيسان@gmail.com (D.T.-S); dani\_chaves@ufpr.br (D.C.-M); anacarolina.wille@yahoo.com.br (A.C.M.W.); valpf@ufpr.br (V.P.F.); fernando\_matsubara@hotmail.com (F.H.M.); luiza\_hg@yahoo.com.br (L.H.G.); senffribeiro@ufpr.br (A.S.-R)

<sup>2</sup> Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, CEP 84030-900 Ponta Grossa, Paraná, Brazil; E-Mail: rafaelbertoni@uepg.br

<sup>3</sup> Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, CEP 80250-060 Curitiba, Paraná, Brazil; E-Mail: oldcar25@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Catholic University of Paraná, Health and Biological Sciences Institute, CEP 80215-901 Curitiba, Paraná, Brazil; E-Mail: w.gremski@pucpr.br

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: veigass@ufpr.br; Tel.: +55-41-33611776; Fax: +55-41-3266-2042.

Received: 21 December 2010; in revised form: 26 February 2011 / Accepted: 17 March 2011 /

Published: 22 March 2011

---

**Abstract:** Venomous animals use their venoms as tools for defense or predation. These venoms are complex mixtures, mainly enriched of proteic toxins or peptides with several, and different, biological activities. In general, spider venom is rich in biologically active molecules that are useful in experimental protocols for pharmacology, biochemistry, cell biology and immunology, as well as putative tools for biotechnology and industries. Spider venoms have recently garnered much attention from several research groups worldwide. Brown spider (*Loxosceles* genus) venom is enriched in low molecular mass proteins (5–40 kDa). Although their venom is produced in minute volumes (a few microliters), and contain only tens of micrograms of protein, the use of techniques based on molecular biology and proteomic analysis has afforded rational projects in the area and permitted the



discovery and identification of a great number of novel toxins. The brown spider phospholipase-D family is undoubtedly the most investigated and characterized, although other important toxins, such as low molecular mass insecticidal peptides, metalloproteases and hyaluronidases have also been identified and featured in literature. The molecular pathways of the action of these toxins have been reported and brought new insights in the field of biotechnology. Herein, we shall see how recent reports describing discoveries in the area of brown spider venom have expanded biotechnological uses of molecules identified in these venoms, with special emphasis on the construction of a cDNA library for venom glands, transcriptome analysis, proteomic projects, recombinant expression of different proteic toxins, and finally structural descriptions based on crystallography of toxins.

**Keywords:** *Loxosceles*, brown spider; venom; recombinant toxins; biotechnological applications

---

## 1. The Spiders of Genus *Loxosceles* and Loxoscelism

The spiders of the *Loxosceles* genus, commonly denoted as brown spiders, belong to the family *Sicariidae*, sub-order *Labidognatha*, order *Araneida*, class *Arachnida*, and phylo *Arthropoda* [1,2]. The *Sicariidae* family also comprises the spiders of *Sicarius* genus. Strong evidences show that the genera *Loxosceles* and *Sicarius* are old, having originated from a common sicariid ancestor and diversified on Western Gondwana, before the separation of the African and South American continents. Both sicariid genera are diverse in Africa and South/Central America. *Loxosceles* spiders are also distributed in North America and the West Indies, and have species described from Mediterranean Europe and China. Apparently African and South American *Sicarius* have a common ancestor and South African *Loxosceles* are derived from this group. New World *Loxosceles* also have a common ancestor and fossil data is consistent with the hypothesis of North America colonization by South American *Loxosceles* via a land bridge predating the modern Isthmus of Panama [3].

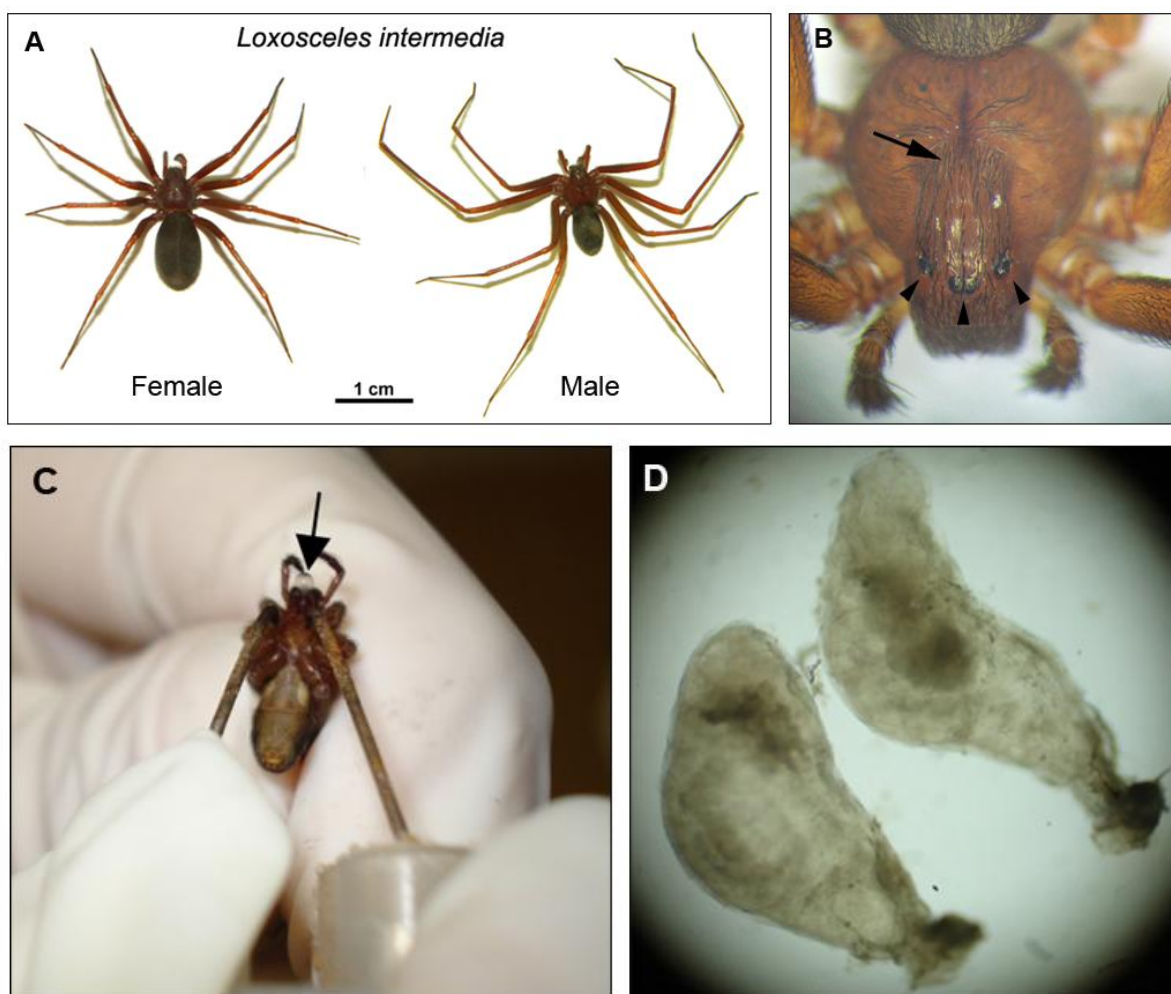
The color of spiders of this genus ranges from a fawn to dark brown (Figure 1A). *Loxosceles* spiders have a violin-shaped pattern on the dorsal surface of their cephalothorax, vary in length from 1 cm to 5 cm, including legs, and have six eyes arranged in non-touching pairs in a U-shaped pattern (Figure 1B). This positioning of eyes has been described as the best means of identifying these brown spiders [4–8]. The brown spiders are sedentary, non-aggressive, have nocturnal habits and prefer to inhabit dark areas. In human habitats, brown spiders are often found behind furniture, pictures and associated with clothes.

Accidents involving *Loxosceles* genus spiders occur mainly in the warmest months of the year, predominantly during spring and summer [4,6]. The condition caused by brown spiders, categorized as Loxoscelism, is associated with a series of clinical symptoms including cutaneous lesions, which spread gravitationally from the spider bite. The lesions are characterized by necrotizing wounds that are dark blue-violet in color and become indurated, leading to the formation of scar tissue. Surrounding the lesion, there is also erythema and edema. At the systemic level (less frequent than the appearance of skin lesions), patients may experience fever, weakness, vomiting, pruritic reactions, renal failure,



and hematologic disturbances that may include thrombocytopenia, disseminated intravascular coagulation and hemolytic anemia [5,6,8,9].

**Figure 1.** Brown spider aspects. **(A)** *Loxosceles intermedia* adult specimens—female and male. **(B)** Violin-shaped pattern (arrow) on the dorsal surface of cephalothorax from *Loxosceles intermedia* adult spider, and its six eyes arranged in pairs as a semi-circle (arrowheads). **(C)** Venom harvesting by electric shock applied to the cephalothorax. Arrow points for a drop of *Loxosceles intermedia* venom. Briefly, venom is extracted using an electric shock of 15 V applied to the cephalothorax of the spider and the venom from the tips of the fang is collected and diluted in phosphate buffered saline (PBS) or dried and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. **(D)** Brown spider venom glands of *Loxosceles intermedia* observed by stereo dissecting microscope (40X). Venom can be harvested directly from venom glands: the removed glands are washed in PBS and the venom is obtained by gentle compression of the glands.



## 2. The *Loxosceles* Venoms

Over recent years, *Loxosceles* genus spider venoms have been studied by several scientific research groups worldwide, and many different toxins have been identified in the venoms. The corresponding biological and biochemical properties of these toxins have been reported, yielding insights into the pathophysiology of envenomation [4,5,7]. The venom of *Loxosceles* spiders is a complex mixture of protein and peptide toxins with a molecular mass profile ranging from 1 to 40 kDa [5]. To date, several molecules in the *Loxosceles* spider crude venoms have been described, including alkaline phosphatase [5,10], 5'-ribonucleotide phosphohydrolase [5], sulfated nucleosides [11], hyaluronidase [5,12–14], fosfolipases-D [5,15–17], metalloproteases, serine proteases [12,13,18–22] and insecticide toxins [23]. Table 1 contains a brief collection of main features from proteic toxins described in *Loxosceles* genus.

Low molecular weight components, such as neurotoxic and non-neurotoxic peptides, polyamines and other components are poorly studied in *Loxosceles* venom. Using NMR-spectroscopy, Schroeder and colleagues (2008) showed that sulfated guanosine derivatives comprise the major small-molecule components of the brown recluse spider. They detected cross-peaks corresponding to 2,5-disulfated guanosine and 2-sulfated guanosine. It appears that sulfated nucleosides occur in several spider superfamilies, such as Agelenoidea and Amaurobioidea. The physiological properties of the sulfated nucleosides remain largely unexplored [11].

Serine proteases were already described in *Loxosceles* venom as high molecular weight enzymes (85–95 kDa) with gelatinolytic activity activated by trypsin [19]. Proteome and transcriptome analyses of *Loxosceles* venom also described this family of proteases [24,25]. Serine proteases generally are among the best characterized venom enzymes affecting the hemostatic system. However, the exact role of serine proteases in envenomation still remains to be clarified.

Recently, by using a cDNA library and transcriptome analysis, a novel expression profile has been elaborated for *Loxosceles intermedia* gland venom. This recently developed profile has allowed the identification of additional toxins as components of the venom, including insecticidal peptides similar to knottins (molecules that form an inhibitor cystin knot), astacin-like metalloproteases, venom allergen, a translationally controlled tumor protein family member (TCTP), serine protease inhibitors, and neurotoxins similar to Magi 3 [26,27]. Brown spider venoms display a broad diversity of toxin isoforms, including members of the phospholipase-D family and astacin-like toxins, even in the same sample [17,27–29]. Such features, which represent an adaptation to increase the survival of the spiders and the effectiveness of venoms, confer advantages to the spider predator. To confirm the existence of a new family of toxin isoforms, it is necessary to further characterize their biological properties. Recently, a spider toxin database called Arachnoserver which was manually curated [30], has cataloged 54 toxins from Sicariidae spiders family. It was elaborated, based on information gleaned through studies on complex venom mixtures, and has resulted in an exponential increase in the identification of peptide-toxins. King *et al.* [31] recommend a rational nomenclature for naming toxins from spiders and other venomous animals to avoid the continued use of *ad hoc* naming schemes that introduce confusion and make it difficult to compare toxins among species and establish evolutionary relationships.

**Table 1.** An overview of toxin families in *Loxosceles* genus.

Toxins	MW (kDa)	Characteristics and actions described	No. Seq *
Phospholipases-D (SicTox family members, such as LiRecDTs)	30–35	Several isoforms with variant features such as: - Dermonecrosis [12,13,16,32–38] - Lipids hydrolysis [33,39–42] - Hemolysis [38,43–45] - <i>In vitro</i> platelet aggregation [34,36,37] - Infiltration of inflammatory cells [35–37,42] - Edema [34,38] - Renal disturbances [35,46] - Lethality [34,38,46,47] - <i>In vitro</i> cytotoxicity [35,42,46] - Cytokine activation [41,48–50]	335
Insecticidal peptides	5–8	- LiTx family members [23,27] and Magi 3-related peptides [23,27,51] - LiTx: Lethal to <i>S. frugiperda</i> (flaccid paralysis) [23] - LiTx3: appears to act upon Na <sup>+</sup> channels [23]	8
Metalloproteases	28–35	- Astacin-like Metalloprotease (LALPs) [29,52] - Present in the venom of different species of <i>Loxosceles</i> genus [12,13,27,51,53] - Activity upon gelatin, fibronectin, fibrinogen and entactin [18,52–54]	4
Hyaluronidases	41–43	- Classified as endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases [14] - Activity upon hyaluronic acid and chondroitin sulphate [13,14] - Present in the venom of different species of <i>Loxosceles</i> genus [12–14,24,27,51,55]	-
Serine-proteases	85–95	- Gelatinolytic activity [19] - Activated <i>in vitro</i> by trypsin [19] - Present in the venom of <i>L. intermedia</i> and <i>L. laeta</i> [27,51]	-
Serine/Cysteine protease inhibitors	N.D.	- Belongs to Serpin superfamily [27] - Identified in <i>Loxosceles</i> spp. transcriptomes and proteome [24,27,51] - May be related to coagulation processes, fibrinolysis and inflammation [51]	-

Table 1. Cont.

TCTP (translationally controlled tumour protein)	~46	- Identified in <i>Loxosceles</i> spp. transcriptomes [27,51] - Putative functions: Histamine releasing factor in extracellular environment; several intracellular roles such as embryonic development, cell proliferation, stabilization of microtubules [56]	-
Lectin-like	N.D.	- Putative features: carbohydrate-binding molecules; involved in extracellular matrix organization, endocytosis, complement activation, <i>etc.</i> [51]	-
Alkaline-phosphatase	N.D.	- Degrades the synthetic substrate <i>p-nitrophenyl phosphate</i> [10]	-
ATPase	N.D.	- ATP hydrolysis [10]	-

N.D.: not determined. \*Number of sequences deposited in PUBMED protein database.

### 3. The Rational Use of Venom Toxins as Biotechnological Tools

The idea of using venom toxins as tools for biological purposes is currently gaining acceptance worldwide, as researchers incorporate the use of novel technologies to overcome old obstacles such as low venom volumes. Technological advancement has led to better techniques for protein purification; different models for synthesis of recombinant toxins; structural views of molecular domains, binding sites or catalytic sites of molecules of interest; design of synthetic inhibitors or agonists; and finally, cellular and animal models for testing the products obtained. The use of toxins directly as a source of materials to produce medicines or similar products has been receiving much attention from the pharmaceutical industry and experts in the field of applied research. Examples of toxin-derived biomedicines derived from venoms of different animals are abundant. Venoms from snakes, perhaps the best studied example of biotechnological applications among animal venoms, with biologically active toxins in the cardiovascular system, central nervous system, membrane lipids and proteins, hemostatic system, and muscular system, have led to the discovering of several products used in the treatment of various diseases. These drugs include Captopril (blood pressure), Integrilin (acute coronary syndrome), Aggrastat (myocardial infarct and ischemia), Ancrod (stroke), Defibrase (acute cerebral infarction and angina pectoris), Hemocoagulase (hemorrhage), and Exanta (anti-coagulant). Toxin-derived products from snake venoms have also been used for diagnosis. This group of compounds includes Protac (protein C activator, diagnosis of hemostatic disorders), Reptilase (diagnosis of blood coagulation disorder) and Ecarin (diagnostic of hemostatic disorder) (for review, see [57,58]).

Other toxin-derived medicines have been prepared from components of marine cone snail venoms, called conotoxins, which are potent ion channel modulators, and have facilitated the discovery of a novel analgesic agent named ziconide, used in the treatment of pain syndromes [59,60]. The honeybee venom toxin, called tertiapin (TPN), is an inhibitor of potassium channels, has generated TPNLQ, a variant and a potential novel model for the treatment of hypertension [61]. Exenatide (synthetic exendin-4) is a toxin-derived medicine from the venom of Gila monster lizard that stimulates the

production of insulin by pancreatic cells and has the potential to treat type 2 diabetes [62,63]. Scorpion venom toxins have been studied as well, and a large number of molecules with biological activities as pain-killers, agents that control the spread of cancer, and natural insecticides can be generated. Scorpion venom, such as kurtosin and anuroctoxin, can target specific mammalian cell ion channels and their isolation has opened possibilities for drug design in the context of neurologic and autoimmune diseases [64,65]. Other scorpion venom toxins (beta-toxins) can selectively interact with insect voltage-gated sodium channels and can be used as toxin-based pesticides [66]. Sea anemone venom toxins have been reported as potential agents for the treatment of autoimmune diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and type I diabetes [67]. These toxins, such as Shk, a 35-residue polypeptide toxin that is a potassium channel blocker, have proven to be very useful sources of pharmacological tools. Furthermore, the molecule's analogs have been evaluated with regard to the development of new biopharmaceuticals for autoimmune disorders [68,69].

With regard to spider venoms, researchers are involved in the study of insecticidal toxins, which can be used as tools in the elaboration of environmentally safe pesticides. Notably, the venom of the Australian funnel web spider has been analyzed, with emphasis on the toxin omega-atracotoxin (ALTX) HV1, a 37-residue peptide molecule. One model proposes the use of baculoviruses to express spider toxin to act as a pesticide [59,70]. Additionally, spider venom toxins can be used as models for the development of transgenic plants expressing insecticidal toxins. One example of this situation is the case of omega-ACTH-Hvt1 toxin from the venom of *Hadronyche versuta*, which protects the tobacco plant against insects. Another rational use of spider venom toxin as a model for design of therapeutic agents involves use of the toxin from *Phoneutria nigriventer* venom as a tool for the treatment of erectile dysfunction. The toxin Tx2–6 causes an improvement in the level of nitric oxide in penile tissue in rats [71,72]. Additionally, antibacterial peptides were identified in the venom of the *Cupiennius salei* spider. These peptides appear to act as channel-forming toxins within the bacteria wall. Analogous synthetic molecules would be expected to have great potential, especially in the age of multiple-antibiotic-resistant bacteria and related threats to human health [59,73].

The biotechnological uses of *Loxosceles* spider venoms have received increased attention over recent years. Notably, a spider toxin-derived product (ARACHnase) was proposed for the diagnosis of lupus anticoagulant. Also, antisera produced with *Loxosceles* venom has been used as bioproducts for serum therapy after spider accidents (for more information, see [74]). Recently, several recombinant toxins from *L. intermedia*, *L. laeta*, *L. boneti*, *L. gaucho*, and *L. reclusa* have been described. These include members of the phospholipase-D family [32–37,39,43], members of metalloprotease/astacin family [29,52], a member of translationally controlled tumor protein family (TCTP), a hyaluronidase, a serine protease inhibitor, a venom allergen, an insecticide toxin, member of neurotoxin/Magi 3 family, and an insecticidal toxin [75]. Recombinant molecules will not only expand our knowledge of spider biology and the pathophysiology of Loxoscelism, but as we shall discuss in the next chapters, they will also provide additional molecules for biotechnological purposes [74].

#### 4. Phospholipase-D

Phospholipase-D is the most studied type of molecule present in the venom from *Loxosceles* species. In the general literature, these toxins are referred to as sphingomyelinase-D, due to their first

biochemical description as enzymes capable to hydrolyze sphingomyelin substrate. Based on the IUBMB recommendations, these molecules are biochemically classified as sphingomyelin phosphodiesterases D (E.C. 3.1.4.41) [5,6] Dermonecrotic toxin is a biological term widely applied by toxinologists to *Loxosceles* phospholipase-D, due to the hallmark of brown spider bites, which trigger dermonecrosis *in vivo*. Kalapothakis *et al.* [17] have organized dermonecrotic toxins of *L. intermedia* into a protein family, denoted LoxTox, by using cDNA coding sequences of several dermonecrotic/sphingomyelinase proteins from *Loxosceles intermedia*. The authors present at least six distinct groups (LoxTox 1 to 6) based on similarities among the molecules. At the present moment, Arachnoserver [30] includes 49 toxins from the *Loxosceles* genus with biological activity patterns characterized by dermonecrosis; these toxins were denoted as brown spider phospholipase-D proteins or partial sequences following the phylogenetic analyses of sicariid SMases by Bindford *et al.* [1].

The *Loxosceles* and *Scarius* genera uniquely share the dermonecrotic venom toxin phospholipase D within the Haplogyne lineage. The most prospective evolutionary scenario for the origin of this enzyme is a single origin in the most recent ancestor of the Sicariidae family [76]. Phospholipases-D vary in molecular mass between species of North American *Loxosceles* (31–32 kDa), Old World species (32–33.5 kDa) and South American *Loxosceles* (32–35 kDa) [76]. Sphingomyelinase-D activity can be detected in all (36) *Loxosceles* and *Scarius* species already tested. Binford and colleagues (2008) proposed to call this specific gene family *ScTox* towards a rational nomenclature. Based on Bayesian analyses they also resolved two clades of SMD genes, labeled  $\alpha$  and  $\beta$ . Sequences in the  $\alpha$  clade are exclusively from New World *Loxosceles* and *Loxosceles rufescens* and include published genes for which expression products have SMase D and dermonecrotic activity. The  $\beta$  clade includes paralogs from New World *Loxosceles* that have no, or reduced, SMase D and no dermonecrotic activity and also paralogs from *Scarius*. In the context of structural position and proposed active sites [40],  $\alpha$  and  $\beta$  clades differ only in conservation of key residues surrounding the apparent substrate binding pocket [3].

The pathological mechanisms of brown spider phospholipase-D have been continuously investigated, Van Meeteran [48] and Lee and Lynch [41] observed that recombinant *Loxosceles* SMaseD isoforms are able to hydrolyze lysophospholipids, generating bioactive lipid mediators such as lysophosphatidic acid (LPA). These researches extended the boundary of knowledge, which had depended upon sphingomyelin as a well-known substrate molecule. Furthermore, Lee and Lynch [41] also postulate that the term **phospholipase-D (PLD)** would more effectively represent the broad range of hydrolysable phospholipids than previously supposed to be applied for dermonecrotic toxins from *Loxosceles* genus [48]. Nomenclature of these toxins should be updated to account for the recent accumulation of knowledge regarding the biological and biochemical properties of these compounds.

The great interest of toxinologists in PLD proteins, to the neglect of other toxins present in the venom (most of them also enzymes or bioactive peptides), is due to the ability of these proteins to reproduce many effects of necrotic arachnidism or Loxoscelism. The PLDs from the *Loxosceles* genus are described as being responsible for several biological properties ascribed to whole venom, including the following: dermonecrosis, massive inflammatory response with neutrophil infiltration and complement activation, platelet aggregation, immunogenicity, edema and increased blood vessel wall permeability, hemolysis, renal failure, toxicity for several cultured cell types, and animal lethality [4,38,74,77].

Clinical investigations by Futrell [5] indicated that a dermonecrotic factor was responsible for histopathological observations resembling those of the cutaneous Arthus reaction, as observed in victims of accidents with brown spiders. Futrell [5] also reported the native toxin from *L. reclusa* (32 kDa) was an enzyme that hydrolyzes sphingomyelin and releases choline and N-acylsphingosine phosphate (or ceramide 1-phosphate). Various isoforms of phospholipase D were already reported for different species. Using SDS-PAGE analysis and chromatography methods, a range of molecular mass between 30–35 kDa was determined for PLD toxins that have hemolytic, necrotic and platelet aggregation activity, from *L. reclusa*, *L. rufescens*, *L. gaucho*, *L. laeta* and *L. intermedia* venoms [5,15,16,44,47,78,79]. Advances in proteomic studies have facilitated the description of many more PLD-related proteins in whole venom. Luciano *et al.* [80] performed two-dimensional electrophoresis and observed enriched levels of a 30-kDa molecule as well as cationic properties in *L. intermedia* whole venom, indicating the presence of several PLD-related protein spots. Furthermore, proteomic analysis of *L. gaucho* whole venom led to the identification of at least eleven PLD proteins (30–32 kDa ‘loxnecrogin’ isoforms) by Edman chemical sequencing and capillary liquid chromatography-mass spectrometry [25]. In summary, PLDs are dermonecrotic toxins that comprise a family of toxins with different related isoforms that have biological, amino acid and immunological similarities and which are found in diverse *Loxosceles* species [4,27,38,74]. This variation in phospholipase-D molecules may be due to post-translational modification and the expression of paralogous genes, since recent data demonstrate that gene duplications are frequent and that PLD genes lie in a region with high recombination within the genome [3].

Nowadays, heterologous systems based on cDNA sequences encoding mRNA transcripts from the brown spiders are a very useful tool for the production of recombinant PLD proteins (mainly in prokaryotic models). Using extracts of the venom gland, which is the tissue that is specialized for the production and secretion of venom toxins, molecular biology techniques were optimized to obtain several sequences as template for the identification, characterization and recombinant expression of PLD proteins [74].

At present, a new generation of molecules developed through cloning techniques still remains under investigation by researchers aiming to determine molecular and cell mechanisms of PLDs by biological approaches. *L. intermedia* LiD1 recombinant protein (31.4 kDa) is a sphingomyelinase D family molecule without dermonecrotic activity but with antigenic activity [32]. *L. laeta* recombinant protein (33 kDa) is a sphingomyelinase isoform able to degrade sphingomyelin [43]. *L. laeta* recombinant phospholipase-D generates lysophosphatidic acid and induces lysis of red blood cells [41]. Keratinocyte apoptosis was induced by recombinant PLD (SMaseD P2) from *L. intermedia* [81]. Global gene expression changes in fibroblast cells induced by PLD recombinant protein from *L. reclusa* (SMD) are related to components of inflammatory response, such as human cytokines, genes involved in the glycosphingolipid metabolism pathway, and proteins known to impact transcriptional regulation [49]. Six isoforms of phospholipase-D were cloned from a cDNA library of *L. intermedia* gland venom and then expressed; they were shown to have similar toxic effects to those of native venom toxins [34–38]. *L. intermedia* recombinant protein (LiRecDT1, 34 kDa) displays dermonecrotic activity and was able to directly induce nephrotoxicity in mice and cultured tubular epithelial cells [42,46]. It could also induce non-complement-dependent hemolysis *in vitro* and inflammatory response using endothelial cell membrane as target [42,45]. Nephrotoxicity and hemolysis are both toxic effects

that depend directly on catalytic enzyme activity. In the same way, LiRecDT2 (ABB69098), LiRecDT3 (ABB71184), LiRecDT4 (ABD91846), LiRecDT5 (ABD91847), and LiRecDT6 (ABO87656) were identified, cloned and characterized as PLD proteins with high similarity to each other based on sequence alignment; this similarity is due primarily to conserved amino acids at the catalytic site [34–37]. The results of this alignment corroborated with the crystal structure analysis of a dermonecrotic toxin [40] from *L. laeta*, which suggested there were conserved residues at the proposed catalytic site for SMase D. The recent transcriptome analysis of *L. intermedia* venom gland identified at least two clusters (annotated as PLD-related ESTs) as new possibilities for a novel PLD isoform in *L. intermedia* venom, adding a new group to the LoxTox family classification [17,27].

The knowledge of structural, biochemical and biological properties of PLD toxins could be employed in design studies for the development of new drugs, biopharmaceuticals, diagnostic tests and other biotechnological and industrial applications. Immunoassays using brown spider PLDs as probes have been tested [50,82] because differential diagnosis of brown spider bites can often lead to misdiagnosis [83,84]. Moreover, therapeutic serum development and vaccination have been studied to ascertain the benefits of antivenom [85,86]. Synthetic peptides designed based on PLDs toxins with specific biological/protective effects have also been utilized [87,88]. Additionally, brown spider PLDs could be employed in the development of a vaccine derived from the phospholipase-D-mutated toxin from *L. intermedia* (substitution of the Histidine12 for Alanine in the catalytic site—LiRecDT1H12A) for the immunization of people living in regions that are endemic for accidents involving *Loxosceles* spiders. This method may be useful because enzyme activity of LiRecDT1H12A is dramatically decreased and has neither hemolytic activity nor nephrotoxicity [45,46]. Another possible application for PLD is as reagent of immunodiagnostic assays for identification and quantification of phospholipase-D in the sera of patients bitten by *Loxosceles* spider because diagnosis of Loxoscelism is very controversial and is commonly based on clinical signs and symptoms [89]. Brown spider venom may be detected in hair, wound aspirates, and skin biopsy for at least seven days after inoculation [90].

PLD enzyme activity triggers the degradation of the cell membrane phospholipids, loss of membrane asymmetry, phosphatidylserine exposure and membrane reorganization [91–93]. Sphingomyelin degradation changes membrane properties, such as lipid raft organization and membrane fluidity, triggering intracellular pathways [94,95]. Phospholipid metabolites induce the release of prostaglandins, activate the complement cascade, stimulate platelet aggregation, and enhance neutrophil chemotaxis and inflammation. Brown spider PLD toxins could be used in lipid protocols for cell membrane studies related to biological effects of lipid metabolites, with emphasis on sphingolipid-derived bioactive molecules and their signaling pathways. The activity and expression of some phospholipases are increased in several human cancers, suggesting that these enzymes may have central roles in tumor development and progression [96,97]. This involvement raises the possibility of considering phospholipid metabolism as a potential target for the development of new antitumoral agents by using brown spider PLDs as a novel model for tumor cell studies.

Further studies improving the understanding of PLD catalysis are relevant not only for comprehension of phospholipases mechanisms in basic sciences, but also for related pharmaceutical and biotechnological applications [98]. The catalytic activity of brown spider PLD plays a role in the pathological activity of this toxin and therefore cannot be dismissed as a rational target for new



strategies to treat Loxoscelism. Degradation of the phospholipid head-groups by brown spider PLDs changes membrane surface potential and affects the functional properties of some cation channels. Brown spider PLDs can offer an effective pharmacological way to activate voltage-gated channels that could be useful for “channelopathy” studies [99]. Certainly, elucidation of the roles of PLDs in a variety of molecular and cell biology mechanisms might be the greatest value of brown spider PLDs as a biotechnological product, which depends on their continuous characterization with regard to the details of pathogenesis and biochemistry.

## 5. Hyaluronidase

Hyaluronidases are enzymes that mainly degrade hialuronic acid (HA), and which may have activity upon chondroitin, chondroitin sulfate (CS) and, to a limited extent, dermatan sulfate (DS) [14,100,101]. The hyaluronidases are a group of enzymes that are distributed widely throughout the animal kingdom. They were discovered through the observation that extracts of some tissues contained a “spreading factor”, which facilitated the diffusion of dyes and subcutaneous antiviral vaccines [102]. These enzymes are present in the venoms of multiple organisms, such as lizards, scorpions, spiders, bees, wasps, snakes and stingrays [103–105].

Hyaluronidases in venoms have been described as “spreading factors” due to their ability to degrade extracellular matrix components and to increase the diffusion of other toxins in tissues adjacent to the inoculation site [103]. Data from crystallography and X-ray diffraction suggested the evolutionary conservation of many poison hyaluronidases in a comparative study of several animal venoms [106,107]. Tan and Ponnudurai [108] reported that all venoms exhibit a wide range of hyaluronidase and protease activities. With regard to spider venoms, Kaiser [109] was the first to report hyaluronidase activity, from Brazilian *Lycosa raptoral* spiders, now known as *Phoneutria nigriventer* [110]. Shortly after that report, hyaluronidase activity was detected in the venom of European window spider *L. tredecimguttatus* and of the tarantula *D. hentzi* venom. This enzyme was isolated from the funnel web *A. robustus* and the tarantula *E. californicum* venom [111]. Spider venom hyaluronidases have been described more recently in *Lycosa godeffroy*, *Lympoma cylindrata/murina* [110] and *Cupiennius salei* [112]. The *Hipassa* genus showed similar hyaluronidase activity to that of *H. agelenoides*, *H. lycosina* and *H. partita* species [110,113]. Moreover, venom obtained from *Vitalius dubius*, a spider found in southeastern Brazil, showed high levels of hyaluronidase activity [114]. With regard to necrotizing Australian spiders, hyaluronidase activity was demonstrated in *Badumna insignis*, *Loxosceles rufescens*, and *Lampona cylindrata* [12].

In 1973, Wright *et al.* were the first to describe hyaluronidase activity in venom of the genus *Loxosceles* [55]. This work was performed with *L. reclusae* venom, and the purified enzymes, which were estimated to have molecular weights of 33 and 63 kDa by SDS-PAGE [115], exhibited activity against HA and CS types A, B, and C. The authors also showed that rabbit anti-venom inhibited the spreading effect exhibited by whole venom *in vivo* and completely inhibited hyaluronidase activity *in vitro* [55]. Young and Pincus [12], analyzing *L. reclusae* venom, described hyaluronidase activity for a protein determined to be 32.5 kDa by HA-substrate SDS-PAGE [12,115]. Barbaro *et al.* [13] studied venoms from five *Loxosceles* species of medical importance in the Americas (*L. deserta*, *L. gaucho*, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusae*).

Hyaluronidase activity was detected in all species of *Loxosceles* spider venom tested by HA zymogram. All venom samples contained an enzyme with molecular weight of approximately 44 kDa, which was able to digest HA and which may contribute to the characteristic gravitational spread of the dermonecrotic lesion in patients suffering from the effects of these venoms [13,115]. da Silveira *et al.* [14] reported that zymography showed *L. intermedia* venom included hyaluronidase molecules of 41 and 43 kDa molecular weight. The activity of these enzymes is pH-dependent, with optimal activity between 6 and 8, and was able to degrade HA in rabbit skin. Pedrosa *et al.* [51] studying *L. laeta* transcriptome found transcripts with similarity to *Bos Taurus* 'hyaluronidase' (gb|AAP55713.1): 4 clones and 1 cluster (LLAE0048C), representing 0.13% of the total sequence. In addition, hyaluronidase represents only 0.1% of all total toxin-encoding transcripts in the venom gland of *L. intermedia* [27]. This result may explain the difficulty associated with purification this enzyme from *Loxosceles* venoms. To obtain the recombinant hyaluronidase from *L. intermedia* venom, through the use of appropriate molecular biology techniques, an isoform was cloned and showed to have a theoretical molecular mass of about 46.1 kDa [75].

Hyaluronidase-mediated degradation of HA increases membrane permeability, reduces viscosity and renders tissues highly permeable to injected fluids. This degradation process is involved in bacterial pathogenesis, the spread of toxins and venoms, fertilization, and cancer progression [102]. Therefore, brown spider hyaluronidase could be used therapeutically in many fields, including orthopedics, surgery, ophthalmology, internal medicine, oncology, dermatology and gynecology [74]. There are several studies showing that hyaluronidases can be used to promote resorption of excess fluids, to increase the effectiveness of local anesthesia and to diminish tissue destruction by subcutaneous and intramuscular injection of fluids [100,102]. For example, hyaluronidase has been used to reduce the extent of tissue damage following extravasation of parental nutrition solution, electrolyte infusions, antibiotics, aminophylline, mannitol and chemotherapeutic agents, including Vinca alkaloids [116].

Additionally, recombinant human hyaluronidase (rHuPH20) has been used in chronic pain management, to improve systemic absorption and bioavailability of drugs [117–120]. In the context of cancer therapy, testicular hyaluronidase (HAase) has been added to drug regimens to improve drug penetration. In limited clinical studies, HAase has been used to enhance the efficacy of vinblastin in the treatment of malignant melanoma and Kaposi's sarcoma, among other cancers [121]. Furthermore, when the level of HA decreases under conditions in which hyaluronidase activity increases, the moisture and tension of the skin are reduced, and histamine is released from mast cells [122]. Therefore, the identification and characterization of hyaluronidase inhibitors could be relevant to the development of contraceptives, as well as anti-tumor, anti-microbial, and anti-venom, anti-wrinkle, and anti-aging agents, and allergy and inflammation suppressors [14,122–124]. Therefore, *Loxosceles* recombinant hyaluronidases are associated with numerous potential applications [27,74,125,126].

## 6. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP)

*Loxosceles intermedia* TCTP protein was identified during an *L. intermedia* venom gland transcriptome study [27], although another spider TCTP had already been described from the venom gland of *Loxosceles laeta* by transcriptome analysis [51]. Proteins of the TCTP superfamily were first

identified in the late eighties by research groups studying translationally regulated genes. These proteins were named *translationally controlled tumor proteins* when the discovery of human cDNA was published [127]. This name was based on the protein's tumoral origin, a human mammary carcinoma, and on the observation that TCTP is regulated at the translational level. The translationally controlled tumor protein (TCTP), which was initially named P21, Q23 and P23 by three different groups and is also called HRF (histamine-releasing factor), represents a large family of proteins that are highly conserved and ubiquitous in eukaryotes [56,128].

Sequence alignment studies of TCTP sequences revealed that nearly 50% of all amino acid residues are preserved. Among species from the same genus, TCTPs are completely conserved [56]. When the TCTP sequence found in the *L. intermedia* venom gland transcriptome was compared with the one described in the venom gland of *L. laeta*, 97% similarity was observed. *L. intermedia* TCTP also presented important similarities with the other arthropod TCTPs, such as *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* from mites [27]. The scientific community's understanding of TCTP's biological function is growing. The compound possesses a wide range of functions, and different biochemical roles are currently being established [56,129].

Although TCTP participates in various biological functions, the primary physiological roles of this protein are still unknown [130]. TCTP is widely expressed in many tissues and cell types, and its protein levels are highly regulated in response to a wide range of extracellular signals and cellular conditions [56]. Interactions between TCTP and other cellular proteins have already been reported for tubulin [131], actin-F [132], the mammalian Plk [133], translation elongation factors eEF1A and eEF1Bbeta [134], Mcl-1 [135,136], TSAP6 [137], Na,K-ATPase [138], Bcl-XL [139] and Chrf [140]. Studies have already shown that TCTP is essential for embryonic development and cell proliferation in mice and *Drosophila* [141,142]. Moreover, the protein has calcium-binding activity and is capable of stabilizing microtubules, a property that may be related to a possible role of TCTP in cell cycle control, as it was also shown that TCTP interacts with a checkpoint protein (Chrf) [56,140].

*Loxosceles intermedia* transcriptome analysis highlighted TCTP transcript as a toxin-coding messenger due to TCTP extracellular activities already described above [27]. TCTP was described as a protein that triggers histamine release in basophil leukocytes and was therefore called 'histamine release factor' (HRF) [128]. Then, other studies reported that TCTP presents more general 'cytokine-like' activity, as it also induces the production of interleukins from basophils and eosinophils [143]. TCTP itself is induced by certain cytokines and acts as a growth factor for B-cells [144]. Studies demonstrate that TCTP triggers histamine release in basophile leukocytes by mechanisms that may be dependent on or independent of the presence of IgE. It is believed that a specific TCTP receptor may participate in the process, leading to mast cell activation [56]. Although TCTP protein was found in biological fluid of asthmatic or parasitized patients and in saliva from ticks, TCTP mRNAs do not code for a signal sequence and no precursor protein has been described [56,145]. TCTP secretion from cells proceeds via an endoplasmic reticulum/Golgi-independent or non-classical pathway, probably mediated by secreted vesicles called exosomes, which have been suggested as possible pathways for non-classical secretion [137,145]. In the case of the *Loxosceles* venom gland, TCTP is secreted via holocrine secretion [27]. TCTPs have been described in gland secretions of many arthropods, such as ixodid ticks and in the venom gland of the wolf spider [146–148].

*L. intermedia* TCTP is very similar to *Dermacentor variabilis* TCTP, which is expressed in diverse tissues from the tick, including its salivary gland. When this TCTP was cloned and expressed as a recombinant protein, it was able to release histamine from a basophilic cell line [27,146]. Based on these data, it is possible to suggest that *L. intermedia* TCTP may act as a histamine release factor. The presence of a component in *L. intermedia* venom related to the histaminergic activity of venom supports with this hypothesis [149]. Recently, some authors have called attention to the role of histamine and its receptors in the development of edema, involving increased vascular permeability and vasodilatation [150], which occurs in Loxoscelism. Histamine had been described as the principal pharmacological component in the venom of the wolf spider (*Lycosa godeffroyi*) [148,151]. Proteins of the TCTP family were described to be expressed in human parasites suggesting that could be related to the survival mechanisms of parasites in the host and to the onset of pathological processes [152–154]. The antimalarial drug artemisin [155], probably acts on *Plasmodium* TCTP, confirming its important function in the development of pathology [153,154].

Recently, an increasing number of researchers have focused their attention on the cellular and extracellular activities of TCTP, as it has been implicated in the promotion of cell growth and tumorigenesis as well as in protection against apoptosis and other consequences of cell stress [56,156–158]. TCTP protein levels are upregulated in cancer cells and in human tumors [159–161]. Downregulation of TCTP has been implicated in biological models of tumor reversion [159,162], and the protein is the target of various anticancer drugs [159,163]. TCTP has been proposed as a potential cancer biomarker [160,164,165] and therapeutic target [166].

TCTP has enormous biotechnological potential; this toxin presents a wide range of putative applications: from a biological tool at research laboratories to clinical oncology, as a biomarker and/or a model for drug design to cancer treatment. Drugs that cause inhibition of TCTP activity resulted in tumor growth inhibition both *in vitro* and *in vivo* [159]. TCTP and its biological tools (e.g., antibodies against TCTP) can also be used in experimental oncology to study tumor cell behavior and metabolism, as well as in the screening of anticancer drugs. Still in the field of cell proliferation, TCTP and its related biological tools could also be used to study cell cycle regulation and the microtubule cytoskeleton, as well as its role in cell physiology and organelle transport.

Calcium metabolism and signaling are other issues that could be explored using TCTP and its derived biological tools. Antiapoptotic activities were also described for TCTP: this protein potentiates MCL1 and BCL-X<sub>L</sub> inhibits BAX [158]. These effects highlight TCTP as a candidate for apoptosis studies, as an apoptotic drug and as a model for anti-apoptotic reagents. Another possible application of this toxin could be its employment in allergic screening tests, due to TCTP's histaminergic activity. Inhibitors of TCTP are putative anti-histaminic drugs and other TCTP-derived biological tools could be useful at research laboratories that study histamine release, mast cell metabolism and activation, immediate hypersensitivity reactions and the allergy process in general. Protocols that involve proliferation of B cells represent other potential applications for TCTP. TCTP secretion to the extracellular milieu is mediated by a non-classical pathway involving exosomes [137]; therefore, it is a good reagent with which to study this type of cellular secretion. TCTP has a surprising number of different functions as described here, but how these different functions might be interrelated remains to be determined [167]. Therefore the putative applications suggested herein are just the first insights into the potential uses and applications of TCTP in the field of biotechnology.

## 7. Astacin-Like Metalloproteases

Metalloproteases in *Loxosceles* venom were first characterized in *L. intermedia* venom. Feitosa *et al.* [18] described two metalloproteases, Loxolisin A (20–28 kDa, with fibronectinolytic and fibrinogenolytic activity) and Loxolisin B (32–35 kDa, with gelatinolytic activity). Zanetti *et al.* [168] purified a 30 kDa molecule with fibrinogenolytic activity from *L. intermedia* crude venom. Furthermore, da Silveira *et al.* [53] showed that venom gland extracts from brown spiders possess proteolytic activity, and this activity could be inhibited by bivalent chelators. This study proved that metalloproteases are components of *L. intermedia* and *L. laeta* venoms, and eliminated the possibility that electrostimulated venom could have been contaminated with digestive hydrolytic enzymes during extraction [53].

Metalloproteases were also identified as components of different *Loxosceles* species venoms, such as *L. rufescens*, *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. deserta* and *L. reclusa* [12,13,51,168]. Recently, a recombinant metalloprotease from the *L. intermedia* venom gland, named LALP (*Loxosceles* astacin-like metalloprotease), was characterized as an astacin-like enzyme. This functional characterization supported previous data describing metalloproteases in *Loxosceles* venom [52]. The identification of LALP in *L. intermedia* venom was the first report in the literature of the presence of an astacin family member as an animal venom constituent. Trevisan-Silva *et al.* [29] described two new astacin-like toxin isoforms from *L. intermedia* venom (LALP2 and LALP3) and found that metalloproteases in *L. laeta* and *L. gaucho* venoms are also members of the astacin family. This study described the presence of a gene family of astacin-like toxins in three *Loxosceles* species suggesting that these molecules will be found in all South America *Loxosceles* species [29]. Astacin-like proteases are the second most commonly expressed class of toxins in the *L. intermedia* venom gland, comprising 9% of all transcripts [27].

The astacin family enzymes are zinc-dependent metalloproteases, which are considered as part of the metzincin superfamily [54,169]. Members from the astacin family are ubiquitous, existing more than 200 described astacins, which are found in some bacteria species and in all animal kingdoms [169–173]. Astacins are characterized by the zinc-binding motif (**HEXXHXXGXXHEXXRXDR**), which contains three histidine residues that are responsible for the complexation of zinc. Below the active site, all astacins have a methionine residue within a typical Met-turn (**SXMX<sub>Y</sub>**), with a tyrosine residue that might be involved in substrate fixation [54,169,174–176]. This protease family was named after the identification of astacin from freshwater crayfish, *Astacus astacus*. Astacin is the prototypical digestive collagenolytic enzyme of the astacin family [177,178]. Astacin family members are reported to have a wide range of functions, playing roles in digestion, in peptide and matrix molecules processing, in the activation of growth factors and in the degradation of distinct proteins [169,174,175].

We have little information about the biochemical and biological function of *Loxosceles* venom astacins because astacin members have distinct functions and the study of astacins from *Loxosceles* venoms is just beginning. Previous studies of *Loxosceles* metalloproteases have shown that they degrade some matrix proteins (fibronectin, fibrinogen, gelatin and entactin), but the mechanism involved in the noxious effect of the venom is until unclear [18,20,21,52]. It has been suggested that astacin toxins could be involved in gravitational spreading of dermonecrosis, in hemorrhagic

disturbances observed in accidents, imperfect platelet adhesion and increased vascular permeability, which can occur near bite sites after brown spider accidents [13,29,52]. Also, astacin proteases could act as a spreading factor for other venom toxins and could serve as important agents, in the processing of other venom toxins, by cleaving inactive proteins and generating active peptides that may be involved in *Loxoscelism* effects [29,52].

Astacin-like proteases are biologically active enzymes that have potential applications in pharmaceutical studies and could be used as tools for research protocols [74]. The enzymatic activities of astacins upon different proteins highlight these molecules as useful tools in studies involving protein degradation, especially the degradation of extracellular matrix (ECM) components. Considering the physiological and pathological events related with ECM degradation, astacins can be used in protocols for medical and pharmaceutical research, such as ECM assembly and remodeling (including collagen processing and the healing process). Drug administration (as a co-adjuvant), cell membrane metabolism, embryogenesis, cellular differentiation (including stem cells), tumorigenesis and metastasis, enzymatic activation (latency and activation of zymogens), cell signaling based on proteolysis, inflammatory response and vascular permeability are other potential applications for these molecules.

Astacins from *L. intermedia* could also be used as starting materials to design new drugs/molecules, as agonists and/or inhibitors. One possible therapeutic use of astacins from *L. intermedia* is the context of vascular diseases (acute myocardial infarction, acute ischemic stroke, thrombosed aortic aneurysms, pulmonary embolism, etc.) and as thrombolytic agents. At present, intravenously administered tissue plasminogen activator (IV-TPA) remains the only FDA-approved therapeutic agent for the treatment of ischemic stroke within three hours of symptom onset. Although intra-arterial delivery of the thrombolytic agent seems effective, various logistic constraints limit its routine use and, as yet, no lytic agent has received full regulatory approval for intra-arterial therapy [179]. Moreover, astacin inhibitors may be therapeutically useful in atherosclerosis prevention. Meprins, which are members of the astacin family, hydrolyze and inactivate several endogenous vasoactive peptides, some of which could alter various functions of cells in the arterial wall. Recent studies have shown that a meprin inhibitor suppresses the formation of atherosclerotic plaques [180]. The recombinant astacins could also be used as reagents for laboratorial tests to diagnose *Loxoscelism*, as well as anti-*loxosceles* serum production, in the treatment of envenomation.

## 8. Insecticidal Peptides

Spider venoms are functionally related to defense against predators and primarily used to paralyze and capture natural prey, especially insects [89,181–183]. To execute these functions, spiders developed an arsenal of insecticidal molecules in their venoms, resulting in a combinatorial peptide library of insecticidal peptides that has been improved over the course of evolution [184]. Such peptides consist of single-chain, low molecular weight molecules of 3–10 kDa, with a high number of cysteine residues that form intramolecular disulfide bridges [185,186]. Over the last decade, these peptides have been investigated extensively through identification, purification, characterization and cloning studies [23].

The insecticidal peptides act in the nervous system of prey or predator, causing paralysis or even death, by interacting with specific neuronal ion channels of the excitable membranes [183]. These peptides can be classified depending on their mode of action, such as effects on sodium ( $\text{Na}^+$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ) and chloride ( $\text{Cl}^-$ ) ion channels [111,187]. Many of these peptides present a structural motif designated as an inhibitory cystine knot (ICK), and therefore these molecules are named *knottins*. The ICK motif is composed of a triple-stranded, anti-parallel  $\beta$ -sheet, stabilized by a cystine knot containing three disulphide bridges [188,189], which confer rigidity to the molecules in addition to a stabilization of their secondary structures and relative resistance to denaturation [190].

Although there are a great number of insecticidal peptides characterized in several spider species, little is known about insecticidal molecules in *Loxosceles* spiders. By studying *L. intermedia* venom, de Castro *et al.* [23] first described and characterized three isoforms of insecticidal peptides named LiTx1, LiTx2 and LiTx3 which contain ICK motif and act on specific ion channels. The chromatographic fraction containing these peptides showed potent insecticidal activity against the agricultural pests *Spodoptera* species. LiTx1 (7.4 kDa) presents some sites to possible post-translational modifications, such as N-myristoylation, protein kinase C phosphorylation, amidation and casein kinase II phosphorylation. With regard to its specificity, the study was not able to determine whether LiTx1 interacts with  $\text{Na}^+$  or  $\text{Ca}^{2+}$  channels. LiTx2 (7.9 kDa) and may present N-myristoylation, protein kinase C phosphorylation and amidation sites. Its specificity to ion channels was not determined. LiTx3 peptide (5.6 kDa) has also sites for N-myristoylation and protein kinase C phosphorylation. Based on bioinformatic analyses, de Castro, *et al.* hypothesized that LiTx3 may interact with  $\text{Na}^+$  channels. In 2006, a new isoform, LiTx4, was identified (GenBank n° DQ388598.1).

Transcriptome analysis of the *L. intermedia* venomous gland revealed ESTs with similarity to LiTx peptides described by de Castro *et al.* [23]. LiTx3 was the most abundant sequence in the *L. intermedia* transcriptome, comprising 32% of toxin-encoding messengers. LiTx2 had a representativeness of 11% in relation to the toxin-encoding transcripts. [27]. The transcriptome analysis of *L. intermedia* venomous gland additionally revealed the presence of another class of ion channel-binding peptides. These peptides present similarity to neurotoxin Magi 3, a peptide isolated by Corzo *et al.* [26] from the venom of the *Macrothele gigas* spider. Magi 3 peptide is able to paralyze insects, although the authors did not confirm whether Magi 3 is specific for insect sodium channels or also acts on calcium channels [191].

The specificity of insecticidal peptides for ion channels provides an important tool to understand their dynamic activity. Ion channels are transmembrane proteins involved in the control of ion fluxes across the membrane, regulating membrane potential and ion balance. Their activity is also related to the coordination of diverse cellular functions such as excitation-contraction coupling, hormone and neurotransmitter secretion and gene expression. Thus, the comprehension of the interaction between peptide-ionic channels allows a more refined investigation of the physiological role of ion channels, as well as the determination of possible therapeutic applications [192].

The ability to discriminate insect ion channels confers to insecticidal peptides with considerable potential in the development of an efficient bioinsecticide for the control of economically disadvantageous pests or insect vectors of new or re-emerging disease [182,193]. Recombinant baculovirus containing the gene encoding an insecticidal peptide has been studied and tested against many insect pests, such as *Heliothis virescens* (cotton bollworm), *Laspeyresia pomonella*

(codlingmoth) and *Neodiprion sertifer* (European sawfly) [183,194]. This biotechnological development could lead to alternative methods for chemical control, resulting in many benefits to the agricultural sector that will ultimately reduce economic losses.

## 9. Serine Protease Inhibitors

The control of proteases is normally achieved by the regulation of expression, secretion, activation of proenzymes and degradation. A second level of control is based on specific inhibition of activity. Despite microorganisms that produce non-proteinaceous compounds that block host proteases, the remaining all known natural protease inhibitors are proteins [195–197]. Among these natural protease inhibitors, the most extensively studied and described protein inhibitors of proteases are the group of serine protease inhibitors.

Serine protease inhibitors can be classified into one of three different types, according to their structures and the mechanism of inhibition: the canonical inhibitors, the non-canonical inhibitors and the serpins. The largest group is the canonical inhibitors, which are small proteins (14 to ~200 amino acid residues) represented mainly by the Kazal, BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor), potato I and STI (soybean trypsin inhibitor) families [198,199]. Non-canonical are usually found in blood-sucking organisms and are responsible for blocking the blood-clotting cascade [196]. Serpins (~~serine~~ ~~protease~~ ~~inhibitors~~) are large proteins (typically 350 to 500 amino acids in size), also widely distributed in nature, and are abundant in human plasma. Similar to the canonical inhibitors, serpins exhibit binding loops and interact with the target enzyme in a substrate-like manner. However, cleavage of the serpin loop by the protease leads to dramatic conformational changes in the global structure of the inhibitor [196,200,201].

In brown spider venom, protease inhibitors were first reported in *L. laeta* [51]. The transcriptome analysis approach, which detected 0.6% of sequences with identity to intracellular coagulation inhibitor from *Tachypleus tridentatus* and sequences with identity to serine (or cysteine) proteinase inhibitors from *Mus musculus*, *Aedes aegypti*, *Branchiostoma lanceolatum*, *Gallus gallus*, and *Boophilus microplus*. Similar results were obtained for *L. intermedia* [27], in which one transcript presented significant similarity with a serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade I, member 1 from *Mus musculus*. In both cases (*L. laeta* and *L. intermedia*), the sequences analyzed were similar to serine proteinase inhibitors belonging to the Serpin superfamily.

Playing roles as potential toxins, serine protease inhibitors have been intensively described in several snake venoms, especially for those of the *Elapidae* and *Viperidae* families [202]. In these venoms, the majority of inhibitors characterized belong to the canonical type, particularly the Kunitz/BPTI inhibitors of trypsin and chymotrypsin. The peptides were typically 6–7 kDa in size and were isolated from crude venoms and studied by different methods [203–210]. The identification of this type of molecule allowed future isolation and further characterization of putative protease inhibitors, suggesting the possibility of a biotechnological application. The best example for this purpose is Textilinin-1, which is a well-known 6.7 kDa Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the snake *Pseudonaja textilis* which binds and blocks certain proteases, including plasmin and trypsin [211]. The ability to reversibly inhibit plasmin has raised the possibility of using this drug as an alternative to aprotinin (Trasylo<sup>®</sup>), as a systemic antibleeding agent in cardiac surgery. Like



aprotinin, Textilinin-1 (in equimolar concentrations) almost completely inhibits tissue plasminogenactivator-induced fibrinolysis of whole blood clots. In mouse bleeding models, Textilinin-1 shows shorter time of hemostasis compared to aprotinin and appears to be a more specific plasmin inhibitor than aprotinin [210–212].

Despite their presence in the majority of snake venoms, serine protease inhibitors have also been described and characterized in other organisms. Zhao *et al.* [213] isolated and characterized a 60 kDa serpin from skin secretions of *Bufo andrewsi*, which was denoted as Baserpin. This protein was able to irreversibly inhibit trypsin, chymotrypsin and elastase. Serine protease inhibitors are also present in spider venoms, particularly in the venom of tarantulas (*Ornithoctonus huwena* and *Ornithoctonus hainana*). The prototypic molecule in tarantula venom is HWTX-XI, 6.1 kDa peptide from *Ornithoctonus huwena* venom, which belongs to the Kunitz-type family of serine protease inhibitors. Just like Kunitz-type toxins in snake venoms, HWTX-XI is considered to be a bi-functional toxin because it is a strong trypsin inhibitor as well as a weak Kv1.1 potassium channel blocker [214].

Zhao *et al.* [213] isolated and characterized a 60 kDa serpin from skin secretions of *Bufo andrewsi*, which was denoted as Baserpin. This protein was able to irreversibly inhibit trypsin, chymotrypsin and elastase. The considerations above represent just a few insights concerning serine protease inhibitors uses and applications. The great importance of proteases in numerous different biological processes and the large number of protease inhibitors described suggest their strong biotechnological potential.

## 10. Conclusion

Research in brown spider venom toxins has increased over recent years, but the challenges and opportunities are enormous. To move the field forward, scientists must have access to the biodiversity of spiders within their countries. Different *Loxosceles* genus spider species are reported to inhabit every continent [5,6,8], and bureaucracy related to the capture of spiders should not be a hindrance to researchers on toxinology area. Official collaborations with groups based where brown spiders are endemic will facilitate access to their venom.

Another difficulty in working with *Loxosceles* venoms is the fact that the volume of venom is minute (just microliters, containing a few micrograms of protein, as previously discussed). This makes work difficult for researchers that use crude venom in their experiments. To overcome this difficulty, works can collect venom from hundreds, or even, thousands, of spiders during specific periods of the year when there is an abundance of spiders and store the venom under appropriate conditions (*i.e.*, lyophilized or in solutions at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [18]. Alternatively, brown spiders could be captured from the wild and kept individually (because they kill one another) under laboratory conditions, using insect larvae as food and with periodic hydration via water-soaked cotton balls, with venom collected as necessary.

Another technical solution for venom production is the standardization of long-term primary culture of secretory cells from the venom gland and the production of venom *in vitro*. The culture of secretory cells from different venomous animals has shown promising results, and represents a good system with which to obtain toxins without capturing animals from the wild and without the related ecological disturbances. To date, several groups have reported expertise on this topic, and have established protocols for the primary culture of secretory cells. Examples include those from the venom glands of

*Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* snakes [215,216], as well as those from the venom glands of the *Phoneutria nigriventer* spider [217]. Such protocols ensure that sufficient amounts of native toxins are produced and secreted for culture medium and used for technical purposes after purification. Unfortunately, for *Loxosceles* venom gland cells, there are no reports to date of successful primary cultures of secretory cells. This situation represents a rational challenge for the future regarding the acquisition of sufficient amounts of native molecules. Finally, the venom of *Loxosceles* species is commercially available, as is the case for *L. deserta* (Sigma, St. Louis, USA).

The cDNA library construction of *L. intermedia* venom gland [35], transcriptome analysis [27,51] and the cloning and synthesis of several recombinant toxins [29,32–37,39,43,52] is helping to elucidate the biology of *Loxosceles* genus and opening possibilities for biotechnology applications. Recombinant toxins have been expressed in bacteria, simple organisms that are easy to manipulate and cheap to work with; unfortunately these do not generate co- and post-translational modifications such as disulphide bonds and protein glycosylations. Certain recombinant molecules are expressed in their unfolded form, have incorreced conformations, are water insoluble, and have no biological function.

With regard to phospholipase-D family members, these recombinant toxins purified from bacteria have biological functions compatible with those described for native toxins. For native toxins, it was already very well demonstrated that inflammatory response with cytokines release is induced at the bite site, and lipid content might be relevant for tissue damage [218,219]. These recombinant toxins induce dermonecrosis, platelet aggregation, increased vessel permeability, deep inflammatory responses, and phospholipase-D activity [34–37]. On the other hand, a great number of brown spider venom recombinant toxins synthesized by bacteria are water-insoluble and have no biological function. To surpass this technical obstacle, insoluble toxins can be refolded by methods of protein refolding [220], but the final concentration of refolded toxins obtained is generally not enough for biotechnological uses.

Alternatively, toxins can be synthesized using other expression models, such as the yeast *Pichia pastoris* [221], an organism that has subcellular organelles as endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. This yeast is able to perform co- and post-translational modifications of proteins. For *Loxosceles* toxins, preliminary experiments are underway [75], but a frequent problem to be overcome is the hyperglycosylation of secreted proteins, which alters the biological functions of the toxins. Expression in systems of insect cells, such as *Drosophila* Schneider cells, is a possible alternative method [222] because it is a eukaryotic expression system, in which proteins undergo post-translational modifications.

For *Loxosceles* toxins, again, experiments are just beginning and results are preliminary [75], but they can provide secreted toxins that are correctly folded and, in the near future, may be used as tools for biological evaluations. Baculovirus vector for protein expression in insect and mammalian system is also feasible [223], but we do not have information on *Loxosceles* molecules produced using this technique. Finally, the mammalian expression system is a rational alternative for expression of correctly folded recombinant proteins. Mammalian cells have the capacity for proper protein folding and assembly, as well as co- and post-translational modifications [224]. Currently, there are no data on *Loxosceles* venom toxins obtained using this system. However, because this model is a viable method for recombinant proteins of therapeutic use, scientists are expected to explore this system in the future.

The advancement of *Loxosceles* venom toxin research will also involve techniques from proteomic analysis. These techniques generally have high sensitivity and accuracy and normally use low venom concentration for analysis. To date, at least two works have been completed addressing this topic. By using proteomics methodologies, such as bi-dimensional electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and mass spectrometry, eleven isoforms for phospholipase-D toxin were identified in *L. gaucho* venom [25]. In addition, through mass spectrometry analysis using *L. intermedia* crude venom, 39 proteins were identified, and putative effects for envenomation were discussed [24]. The use of combinatorial data from proteomic and molecular biology techniques, such as mass spectrometry, transcriptome analysis and cDNA library constructions, will open possibilities for the discovery of novel toxins in complex venoms [225].

Additionally, in the near future, the biotechnological use of *Loxosceles* toxins could provide information related to the tridimensional structure of identified toxins, through crystallography and X-ray diffraction and/or nuclear magnetic resonance for soluble toxins [59]. Findings in these areas will bring insight related to the molecular structure of toxins and will be very important for the discovery of catalytic sites, sites that interact with natural substrates or ligands, and from such data, synthetic ligands, analogs, or inhibitors could be designed for biotechnological purposes.

Regarding *Loxosceles* spider venom toxins, a recombinant phospholipase-D from *L. laeta* was analyzed by crystallography and X-ray diffraction. The data collected allowed description of the amino acid residues involved in catalysis and metal ion coordination important for sphingomyelinase activity [226]. Experiments using other isoforms of phospholipase-D from *L. intermedia* venom (LiRecDT1, LiRecDT2, LiRecDT6, GFP-LiRecDT1, and LiRecDT1H12A, with a mutation on the catalytic site, [46]) are currently being conducted using crystallography and X-ray diffraction. Additionally, other *Loxosceles* recombinant toxins (enzymes and peptides) could be evaluated and represent potential biological tools in a wide range of fields.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, CAPES, Fundação Araucária-Paraná and Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná, SETI-PR, Brasil.

## References

1. Binford, G.J.; Bodner, M.R.; Cordes, M.H.; Baldwin, K.L.; Rynerson, M.R.; Burns, S.N.; Zobel-Thropp, P.A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 547–566.
2. Platnick, N.I. *The World Spider Catalog*, Version. 9.0.; American Museum of Natural History: New York, NY, USA, 2008.
3. Binford, G.J.; Callahan, M.S.; Bodner, M.R.; Rynerson, M.R.; Nunez, P.B.; Ellison, C.E.; Duncan, R.P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2008**, *49*, 538–553.
4. Appel, M.H.; Bertoni da Silveira, R.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. *Invertebr. Surviv. J.* **2005**, *2*, 152–158.

5. Futrell, J.M. Loxoscelism. *Am. J. Med. Sci.* **1992**, *304*, 261–267.
6. da Silva, P.H.; da Silveira, R.B.; Appel, M.H.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Brown spiders and loxoscelism. *Toxicon* **2004**, *44*, 693–709.
7. Hogan, C.J.; Barbaro, K.C.; Winkel, K. Loxoscelism: old obstacles, new directions. *Ann. Emerg. Med.* **2004**, *44*, 608–624.
8. Swanson, D.L.; Vetter, R.S. Loxoscelism. *Clinics. Dermatol.* **2006**, *24*, 213–221.
9. Lung, J.M.; Mallory, S.B. A child with spider bite and glomerulonephritis: A diagnostic challenge. *Int. J. Dermatol.* **2000**, *39*, 287–289.
10. Sales, P.B.; Santoro, M.L. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *147*, 85–95.
11. Schroeder, F.C.; Taggi, A.E.; Gronquist, M.; Malik, R.U.; Grant, J.B.; Eisner, T.; Meinwald, J. NMR spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14283–14287.
12. Young, A.R.; Pincus, S.J., Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* **2001**, *39*, 391–400.
13. Barbaro, K.C.; Knysak, I.; Martins, R.; Hogan, C.; Winkel, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* **2005**, *45*, 489–499.
14. da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases. *Toxicon* **2007**, *49*, 758–768.
15. Barbaro, K.C.; Ferreira, M.L.; Cardoso, D.F.; Eickstedt, V.R.; Mota, I. Identification and neutralization of biological activities in the venoms of *Loxosceles* spiders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 1491–1497.
16. Cunha, R.B.; Barbaro, K.C.; Muramatsu, D.; Portaro, F.C.; Fontes, W.; de Sousa, M.V. Purification and characterization of loxnecrogin, a dermonecrotic toxin from *Loxosceles gaucha* brown spider venom. *J. Protein Chem.* **2003**, *22*, 135–146.
17. Kalapothakis, E.; Chatzaki, M.; Goncalves-Dornelas, H.; de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Laborne, F.V.; de Moura, J.F.; Veiga, S.S.; Chavez-Olortegui, C.; Granier, C.; Barbaro, K.C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 938–946.
18. Feitosa, L.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Elias, M.C.; Graner, E.; Mangili, O.C.; Brentani, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* **1998**, *36*, 1039–1051.
19. Veiga, S.S.; da Silveira, R.B.; Dreyfus, J.L.; Haoach, J.; Pereira, A.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W. Identification of high molecular weight serine-proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2000**, *38*, 825–839.
20. Veiga, S.S.; Feitosa, L.; dos Santos, V.L.; de Souza, G.A.; Ribeiro, A.S.; Mangili, O.C.; Porcionatto, M.A.; Nader, H.B.; Dietrich, C.P.; Brentani, R.R.; Gremski, W. Effect of brown spider venom on basement membrane structures. *Histochem. J.* **2000**, *32*, 397–408.

21. Veiga, S.S.; Zanetti, V.C.; Braz, A.; Mangili, O.C.; Gremski, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. *Braz J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 843–850.
22. Veiga, S.S.; Zanetti, V.C.; Franco, C.R.; Trindade, E.S.; Porcionatto, M.A.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B. *In vivo* and *in vitro* cytotoxicity of brown spider venom for blood vessel endothelial cells. *Thromb. Res.* **2001**, *102*, 229–237.
23. de Castro, C.S.; Silvestre, F.G.; Araujo, S.C.; Gabriel de, M.Y.; Mangili, O.C.; Cruz, I.; Chavez-Olortegui, C.; Kalapothakis, E. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*. *Toxicon* **2004**, *44*, 273–280.
24. dos Santos, L.D.; Dias, N.B.; Roberto, J.; Pinto, A.S.; Palma, M.S. Brown recluse spider venom: proteomic analysis and proposal of a putative mechanism of action. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 933–943.
25. Machado, L.F.; Laugesen, S.; Botelho, E.D.; Ricart, C.A.; Fontes, W.; Barbaro, K.C.; Roepstorff, P.; Sousa, M.V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. *Proteomics* **2005**, *5*, 2167–2176.
26. Corzo, G.; Gilles, N.; Satake, H.; Villegas, E.; Dai, L.; Nakajima, T.; Haupt, J. Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel. *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 43–50.
27. Gremski, L.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Probst, C.M.; Ferrer, V.P.; Nowatzki, J.; Weinschutz, H.C.; Madeira, H.M.; Gremski, W.; Nader, H.B.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 2403–2416.
28. Binford, G.J.; Cordes, M.H.; Wells, M.A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. *Toxicon* **2005**, *45*, 547–560.
29. Trevisan-Silva, D.; Gremski, L.H.; Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Meissner, G.O.; Mangili, O.C.; Barbaro, K.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S.; Senff-Ribeiro, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). *Biochimie* **2010**, *92*, 21–32.
30. Wood, D.L.; Miljenovic, T.; Cai, S.; Raven, R.J.; Kaas, Q.; Escoubas, P.; Herzig, V.; Wilson, D.; King, G.F., ArachnoServer: A database of protein toxins from spiders. *BMC Genomics* **2009**, *10*, 375.
31. King, G.F.; Gentz, M.C.; Escoubas, P.; Nicholson, G.M. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon* **2008**, *52*, 264–276.
32. Kalapothakis, E.; Araujo, S.C.; de Castro, C.S.; Mendes, T.M.; Gomez, M.V.; Mangili, O.C.; Gubert, I.C.; Chavez-Olortegui, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. *Toxicon* **2002**, *40*, 1691–1699.
33. Tambourgi, D.V.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; van den Berg, C.W.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; Ferracini, M.; Paixao-Cavalcante, D.; Morgan, B.P.; Rushmere, N.K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. *Mol. Immunol.* **2004**, *41*, 831–840.

34. Appel, M.H.; da Silveira, R.B.; Chaim, O.M.; Paludo, K.S.; Silva, D.T.; Chaves, D.M.; da Silva, P.H.; Mangili, O.C.; Senff-Ribeiro, A.; Gremski, W.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 167–178.
35. Chaim, O.M.; Sade, Y.B.; da Silveira, R.B.; Toma, L.; Kalapothakis, E.; Chavez-Olortegui, C.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; von Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *211*, 64–77.
36. da Silveira, R.B.; Pigozzo, R.B.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Dreyfuss, J.L.; Toma, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland. *Biochimie* **2006**, *88*, 1241–1253.
37. da Silveira, R.B.; Pigozzo, R.B.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Silva, D.T.; Dreyfuss, J.L.; Toma, L.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: From cloning to functional characterization. *Biochimie* **2007**, *89*, 289–300.
38. Ribeiro, R.O.; Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Gremski, L.H.; Sade, Y.B.; Paludo, K.S.; Senff-Ribeiro, A.; de Moura, J.; Chavez-Olortegui, C.; Gremski, W.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon* **2007**, *50*, 1162–1174.
39. Ramos-Cerrillo, B.; Olvera, A.; Odell, G.V.; Zamudio, F.; Paniagua-Solis, J.; Alagon, A.; Stock, R.P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon* **2004**, *44*, 507–514.
40. Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; de Andrade, S.A.; Gabdoulkhakov, A.; Betzel, C.; Tambourgi, D.V.; Arni, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 323–329.
41. Lee, S.; Lynch, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). *Biochem. J.* **2005**, *391*, 317–323.
42. Chaim, O.M.; da Silveira, R.B.; Trevisan-Silva, D.; Ferrer, V.P.; Sade, Y.B.; Bóia-Ferreira, M.; Gremski, L.H.; Gremski, W.; Senff-Ribeiro, A.; Takahashi, H.K.; Toledo, M.S.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. *BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2010**, *1811*, 84–96.
43. Fernandes Pedrosa, M.F.; Junqueira de Azevedo I. de, L.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; van den Berg, C.W.; Ramos, C.R.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 638–645.
44. Tambourgi, D.V.; Magnoli, F.C.; Von Eickstedt, V.R.; Benedetti, Z.C.; Petricevich, V.L.; da Silva, W.D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider

- venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4459–4466.
45. Chaves-Moreira, D.; Chaim, O.M.; Sade, Y.B.; Paludo, K.S.; Gremski, L.H.; Donatti, L.; de Moura, J.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; da Silveira, R.B.; Senff-Ribeiro, A.; Veiga, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 655–666.
  46. Kusma, J.; Chaim, O.M.; Wille, A.C.; Ferrer, V.P.; Sade, Y.B.; Donatti, L.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. *Biochimie* **2008**, *90*, 1722–1736.
  47. Barbaro, K.C.; Sousa, M.V.; Morhy, L.; Eickstedt, V.R.; Mota, I. Compared chemical properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). *J. Protein Chem.* **1996**, *15*, 337–343.
  48. van Meeteren, L.A.; Frederiks, F.; Giepmans, B.N.; Pedrosa, M.F.; Billington, S.J.; Jost, B.H.; Tambourgi, D.V.; Moolenaar, W.H. Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10833–10836.
  49. Dragulev, B.; Bao, Y.; Ramos-Cerrillo, B.; Vazquez, H.; Olvera, A.; Stock, R.; Algaron, A.; Fox, J.W. Upregulation of IL-6, IL-8, CXCL1, and CXCL2 dominates gene expression in human fibroblast cells exposed to *Loxosceles reclusa* sphingomyelinase D: Insights into spider venom dermonecrosis. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127*, 1264–1266.
  50. Barrett, S.M.; Romine-Jenkins, M.; Blick, K.E. Passive hemagglutination inhibition test for diagnosis of brown recluse spider bite envenomation. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 2104–2107.
  51. Fernandes-Pedrosa, F.; Junqueira-de-Azevedo, L.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; Kobashi, L.S.; Almeida, D.D.; Ho, P.L.; Tambourgi, D.V. Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 279.
  52. da Silveira, R.B.; Wille, A.C.; Chaim, O.M.; Appel, M.H.; Silva, D.T.; Franco, C.R.; Toma, L.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Dietrich, C.P.; Nader, H.B.; Veiga, S.S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Biochem. J.* **2007**, *406*, 355–363.
  53. da Silveira, R.B.; dos Santos Filho, J.F.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W.; Nader, H.B.; von Dietrich, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon* **2002**, *40*, 815–822.
  54. Stocker, W.; Grams, F.; Baumann, U.; Reinemer, P.; Gomis-Ruth, F.X.; McKay, D.B.; Bode, W. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralsins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 823–840.
  55. Wright, R.P.; Elgert, K.D.; Campbell, B.J.; Barrett, J.T. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, *159*, 415–426.
  56. Bommer, U.A.; Thiele, B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 379–385.

57. Marsh, N.; Williams, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* **2005**, *45*, 1171–1181.
58. Koh, D.C.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 3030–3041.
59. Bailey, P.; Wilce, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg. Med. (Fremantle)* **2001**, *13*, 28–36.
60. Schmidtke, A.; Lotsch, J.; Freynhagen, R.; Geisslinger, G. Ziconotide for treatment of severe chronic pain. *Lancet* **2010**, *375*, 1569–1577.
61. Ramu, Y.; Xu, Y.; Lu, Z. Engineered specific and high-affinity inhibitor for a subtype of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10774–10778.
62. Gedulin, B.R.; Smith, P.; Prickett, K.S.; Tryon, M.; Barnhill, S.; Reynolds, J.; Nielsen, L.L.; Parkes, D.G.; Young, A.A. Dose-response for glycaemic and metabolic changes. 28 days after single injection of long-acting release exenatide in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetologia* **2005**, *48*, 1380–1385.
63. Heine, R.J.; Van Gaal, L.F.; Johns, D.; Mihm, M.J.; Widel, M.H.; Brodows, R.G. Exenatide versus insulin glargine in patients with suboptimally controlled type 2 diabetes: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **2005**, *143*, 559–569.
64. Chuang, R.S.; Jaffe, H.; Cribbs, L.; Perez-Reyes, E.; Swartz, K.J. Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat. Neurosci.* **1998**, *1*, 668–674.
65. Bagdany, M.; Batista, C.V.; Valdez-Cruz, N.A.; Somodi, S.; Rodriguez de la Vega, R.C.; Licea, A.F.; Varga, Z.; Gaspar, R.; Possani, L.D.; Panyi, G. Anurotoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx. 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1034–1044.
66. Gurevitz, M.; Karbat, I.; Cohen, L.; Ilan, N.; Kahn, R.; Turkov, M.; Stankiewicz, M.; Stuhmer, W.; Dong, K.; Gordon, D. The insecticidal potential of scorpion beta-toxins. *Toxicon* **2007**, *49*, 473–489.
67. Diochot, S.; Lazdunski, M. Sea anemone toxins affecting potassium channels. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **2009**, *46*, 99–122.
68. Mirshafiey, A. Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacology* **2007**, *53*, 353–361.
69. Norton, R.S.; Pennington, M.W.; Wulff, H. Potassium channel blockade by the sea anemone toxin ShK for the treatment of multiple sclerosis and other autoimmune diseases. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3041–3052.
70. Fletcher, J.I.; Smith, R.; O'Donoghue, S.I.; Nilges, M.; Connor, M.; Howden, M.E.; Christie, M.J.; King, G.F. The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 559–566.
71. Villanova, F.E.; Andrade, E.; Leal, E.; Andrade, P.M.; Borra, R.C.; Troncone, L.R.; Magalhaes, L.; Leite, K.R.; Paranhos, M.; Claro, J.; Srougi, M. Erection induced by Tx2–6 toxin of *Phoneutria nigriventer* spider: expression profile of genes in the nitric oxide pathway of penile tissue of mice. *Toxicon* **2009**, *54*, 793–801.
72. Andrade, E.; Villanova, F.; Borra, P.; Leite, K.; Troncone, L.; Cortez, I.; Messina, L.; Paranhos, M.; Claro, J.; Srougi, M. Penile erection induced *in vivo* by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*. *BJU Int.* **2008**, *102*, 835–837.



73. Haeberli, S.; Kuhn-Nentwig, L.; Schaller, J.; Nentwig, W. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon* **2000**, *38*, 373–380.
74. Senff-Ribeiro, A.; Henrique da Silva, P.; Chaim, O.M.; Gremski, L.H.; Paludo, K.S.; Bertoni da Silveira, R.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 210–218.
75. Veiga, S.S. Federal University of Paraná, Paraná, Brazil, Personal communication, 2011.
76. Binford, G.J.; Wells, M.A. The phylogenetic distribution of sphingomyelinase D activity in venoms of Haplogygne spiders. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *135*, 25–33.
77. Tambourgi, D.V.; Goncalves-de-Andrade, R.M.; van den Berg, C.W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. *Toxicon* **2010**, *56*, 1113–1119.
78. Barbaro, K.C.; Eickstedt, V.R.; Mota, I. Antigenic cross-reactivity of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxicon* **1994**, *32*, 113–120.
79. Mota, I.; Barbaro, K.C. Biological and biochemical properties of venoms from medically important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. *Toxin Rev.* **1995**, *14*, 401–421.
80. Luciano, M.N.; da Silva, P.H.; Chaim, O.M.; dos Santos, V.L.; Franco, C.R.; Soares, M.F.; Zanata, S.M.; Mangili, O.C.; Gremski, W.; Veiga, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom in renal tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 455–467.
81. Paixao-Cavalcante, D.; van den Berg, C.W.; de Freitas Fernandes-Pedrosa, M.; Goncalves de Andrade, R.M.; Tambourgi, D.V. Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by loxosceles venom sphingomyelinase D. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 61–68.
82. McGlasson, D.L.; Green, J.A.; Stoecker, W.V.; Babcock, J.L.; Calcara, D.A. Duration of *Loxosceles reclusa* venom detection by ELISA from swabs. *Clin. Lab. Sci.* **2009**, *22*, 216–222.
83. Vetter, R.S. Arachnids misidentified as brown recluse spiders by medical personnel and other authorities in North America. *Toxicon* **2009**, *54*, 545–547.
84. Reitz, M. Diagnosis of brown recluse spider bites is overused. *Am. Fam. Physician* **2007**, *76*, 943–944.
85. Pauli, I.; Minozzo, J.C.; da Silva, P.H.; Chaim, O.M.; Veiga, S.S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the Brown spider (*Loxosceles intermedia*). *Toxicon* **2009**, *53*, 660–671.
86. Pauli, I.; Puka, J.; Gubert, I.C.; Minozzo, J.C. The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. *Toxicon* **2006**, *48*, 123–137.
87. Dias-Lopes, C.; Guimaraes, G.; Felicori, L.; Fernandes, P.; Emery, L.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chavez-Olortegui, C. A protective immune response against lethal, dermonecrotic and hemorrhagic effects of *Loxosceles intermedia* venom elicited by a 27-residue peptide. *Toxicon* **2010**, *55*, 481–487.
88. Felicori, L.; Fernandes, P.B.; Giusta, M.S.; Duarte, C.G.; Kalapothakis, E.; Nguyen, C.; Molina, F.; Granier, C.; Chavez-Olortegui, C. An *in vivo* protective response against toxic effects of the

- dermonecrotic protein from *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by synthetic epitopes. *Vaccine* **2009**, *27*, 4201–4208.
89. Gomez, H.F.; Krywko, D.M.; Stoecker, W.V. A new assay for the detection of *Loxosceles* species (brown recluse) spider venom. *Ann. Emerg. Med.* **2002**, *39*, 469–474.
  90. Krywko, D.M.; Gomez, H.F. Detection of *Loxosceles* species venom in dermal lesions: A comparison of 4 venom recovery methods. *Ann. Emerg. Med.* **2002**, *39*, 475–480.
  91. McDermott, M.; Wakelam, M.J.; Morris, A.J. Phospholipase D. *Biochem. Cell. Biol.* **2004**, *82*, 225–253.
  92. Gomez-Cambronero, J. New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. *Sci. World J.* **2010**, *10*, 1356–1369.
  93. Roth, M.G. Molecular mechanisms of PLD function in membrane traffic. *Traffic* **2008**, *9*, 1233–1239.
  94. Huwiler, A.; Kolter, T.; Pfeilschifter, J.; Sandhoff, K. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1485*, 63–99.
  95. Mitsutake, S.; Igarashi, Y. Transbilayer movement of ceramide in the plasma membrane of live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *359*, 622–627.
  96. Rodrigues, R.S.; Izidoro, L.F.; de Oliveira, R.J., Jr.; Sampaio, S.V.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M. Snake venom phospholipases A2: A new class of antitumor agents. *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 894–898.
  97. Su, W.; Chen, Q.; Frohman, M.A. Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis. *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1477–1486.
  98. Majd, S.; Yusko, E.C.; MacBriar, A.D.; Yang, J.; Mayer, M. Gramicidin pores report the activity of membrane-active enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16119–16126.
  99. Ramu, Y.; Xu, Y.; Lu, Z. Enzymatic activation of voltage-gated potassium channels. *Nature* **2006**, *442*, 696–699.
  100. Menzel, E.J.; Farr, C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* **1998**, *131*, 3–11.
  101. Cramer, J.A.; Bailey, L.C.; Bailey, C.A.; Miller, R.T. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1200*, 315–321.
  102. Girish, K.S.; Kemparaju, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.* **2007**, *80*, 1921–1943.
  103. Kemparaju, K.; Girish, K.S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem. Funct.* **2006**, *24*, 7–12.
  104. Magalhaes, M.R.; da Silva, N.J., Jr.; Ulhoa, C.J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: Isolation and characterization. *Toxicon* **2008**, *51*, 1060–1067.
  105. Girish, K.S.; Kemparaju, K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochemistry (Mosc)* **2005**, *70*, 708–712.
  106. Markovic-Housley, Z.; Miglierini, G.; Soldatova, L.; Rizkallah, P.J.; Muller, U.; Schirmer, T. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* **2000**, *8*, 1025–1035.
  107. Skov, L.K.; Seppala, U.; Coen, J.J.; Crickmore, N.; King, T.P.; Monsalve, R.; Kastrop, J.S.; Spangfort, M.D.; Gajhede, M. Structure of recombinant Ves v. 2 at 2.0 Angstrom resolution:

- structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 595–604.
108. Tan, N.H.; Ponnudurai, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C* **1992**, *103*, 299–302.
109. Kaiser, E. Trypsin and hyaluronidase inhibitor of human serum; the inhibition of the proteolytic and hyaluronic acid cleavage enzymes of snake and spider venoms by human serum. *Biochem. J.* **1953**, *324*, 344–350.
110. Nagaraju, S.; Devaraja, S.; Kemparaju, K. Purification and properties of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon* **2007**, *50*, 383–393.
111. Rash, L.D.; Hodgson, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* **2002**, *40*, 225–254.
112. Kuhn-Nentwig, L.; Schaller, J.; Nentwig, W. Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon* **2004**, *43*, 543–553.
113. Nagaraju, S.; Mahadeswaraswamy, Y.H.; Girish, K.S.; Kemparaju, K. Venom from spiders of the genus *Hippasa*: Biochemical and pharmacological studies. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *144*, 1–9.
114. Rocha-e-Silva, T.A.A.; Sutti, R.; Hyslop, S. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon* **2009**, *53*, 153–161.
115. Zobel-Thropp, P.A.; Bodner, M.R.; Binford, G.J. Comparative analyses of venoms from American and African *Sicarius* spiders that differ in sphingomyelinase D activity. *Toxicon* **2010**, *55*, 1274–1282.
116. Goolsby, T.V.; Lombardo, F.A. Extravasation of Chemotherapeutic Agents: Prevention and Treatment. *Semin. Oncol.* **2006**, *33*, 139–143.
117. Dunn, A.L.; Heavner, J.E.; Racz, G.; Day, M. Hyaluronidase: A review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2010**, *10*, 127–131.
118. Muchmore, D.B.; Vaughn, D.E. Review of the mechanism of action and clinical efficacy of recombinant human hyaluronidase coadministration with current prandial insulin formulations. *J. Diabetes Sci. Technol.* **2010**, *4*, 419–428.
119. Etesse, B.; Beaudroit, L.; Deleuze, M.; Nouvellon, E.; Ripart, J. Hyaluronidase: Here we go again. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* **2009**, *28*, 658–665.
120. Misbah, S.; Sturzenegger, M.H.; Borte, M.; Shapiro, R.S.; Wasserman, R.L.; Berger, M.; Ochs, H.D. Subcutaneous immunoglobulin: opportunities and outlook. *Clin. Exp. Immunol.* **2009**, *158*, 51–59.
121. Lokeshwar, V.B.; Selzer, M.G. Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18*, 281–287.
122. Barla, F.; Higashijima, H.; Funai, S.; Sugimoto, K.; Harada, N.; Yamaji, R.; Fujita, T.; Nakano, Y.; Inui, H. Inhibitive effects of alkyl gallates on hyaluronidase and collagenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 2335–2337.
123. Shuster, S.; Frost, G.I.; Csoka, A.B.; Formby, B.; Stern, R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 192–197.

124. Botzki, A.; Rigden, D.J.; Braun, S.; Nukui, M.; Salmen, S.; Hoechstetter, J.; Bernhardt, G.; Dove, S.; Jedrzejewski, M.J.; Buschauer, A. L-Ascorbic acid 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45990–45997.
125. Calvete, J.J. Venomics: Digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. *J. Proteomics* **2009**, *72*, 121–126.
126. Escoubas, P.; King, G.F. Venomics as a drug discovery platform. *Expert Rev. Proteomics* **2009**, *6*, 221–224.
127. Gross, B.; Gaestel, M.; Bohm, H.; Bielka, H. cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor. *Protein Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 8367.
128. MacDonald, S.M.; Rafnar, T.; Langdon, J.; Lichtenstein, L.M. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **1995**, *269*, 688–690.
129. Choi, K.W.; Hsu, Y.C. To cease or to proliferate: New insights into TCTP function from a Drosophila study. *Cell Adh. Migr.* **2007**, *1*, 129–130.
130. Sun, J.; Wu, Y.; Wang, J.; Ma, F.; Liu, X.; Li, Q. Novel translationally controlled tumor protein homologue in the buccal gland secretion of *Lampetra japonica*. *Biochimie* **2008**, *90*, 1760–1768.
131. Gachet, Y.; Tournier, S.; Lee, M.; Lazaris-Karatzas, A.; Poulton, T.; Bommer, U.A. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112*, 1257–1271.
132. Bazile, F.; Pascal, A.; Arnal, I.; Le Clainche, C.; Chesnel, F.; Kubiak, J.Z. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 555–565.
133. Yarm, F.R. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 6209–6221.
134. Cans, C.; Passer, B.J.; Shalak, V.; Nancy-Portebois, V.; Crible, V.; Amzallag, N.; Allanic, D.; Tufino, R.; Argentini, M.; Moras, D.; Fiucci, G.; Goud, B.; Mirande, M.; Amson, R.; Telerman, A. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13892–13897.
135. Liu, H.; Peng, H.W.; Cheng, Y.S.; Yuan, H.S.; Yang-Yen, H.F. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 3117–3126.
136. Li, F.; Zhang, D.; Fujise, K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic. *Protein J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47542–47549.
137. Amzallag, N.; Passer, B.J.; Allanic, D.; Segura, E.; Thery, C.; Goud, B.; Amson, R.; Telerman, A. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein-histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46104–46112.
138. Jung, J.; Kim, M.; Kim, M.J.; Kim, J.; Moon, J.; Lim, J.S.; Kim, M.; Lee, K. Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 49868–49875.
139. Yang, Y.; Yang, F.; Xiong, Z.; Yan, Y.; Wang, X.; Nishino, M.; Mirkovic, D.; Nguyen, J.; Wang, H.; Yang, X.F. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* **2005**, *24*, 4778–4788.

140. Burgess, A.; Labbe, J.C.; Vigneron, S.; Bonneaud, N.; Strub, J.M.; Van Dorselaer, A.; Lorca, T.; Castro, A. Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle. *Oncogene* **2008**, *27*, 5554–5566.
141. Chen, S.H.; Wu, P.S.; Chou, C.H.; Yan, Y.T.; Liu, H.; Weng, S.Y.; Yang-Yen, H.F. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2525–2532.
142. Hsu, Y.; Chern, J.J.; Cai, Y.; Liu, M.; Choi, K.W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* **2007**, *445*, 785–788.
143. Bheekha-Escura, R.; MacGlashan Jr, D.W.; Langdon, J.M.; MacDonald, S.M. Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14–3D10. *Blood* **2000**, *96*, 2191.
144. Kang, H.S.; Lee, M.J.; Song, H.; Han, S.H.; Kim, Y. M.; Im, J.Y.; Choi, I. Molecular Identification of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor as a B Cell Growth Factor. 1. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 6545–6554.
145. Hinojosa-Moya, J.; Xoconostle-Cazares, B.; Piedra-Ibarra, E.; Mendez-Tenorio, A.; Lucas, W.J.; Ruiz-Medrano, R. Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. *J. Mol. Evol.* **2008**, *66*, 472–483.
146. Mulenga, A.; Azad, A.F. The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Exp. Appl. Acarology* **2005**, *37*, 215–229.
147. Rattmann, Y.D.; Pereira, C.R.; Cury, Y.; Gremski, W.; Marques, M.C.A.; da Silva-Santos, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: Involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon* **2008**, *51*, 363–372.
148. Rash, L.D.; King, R.G.; Hodgson, W.C. Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (*Lycosa godeffroyi*). *Toxicon* **1998**, *36*, 367–375.
149. Paludo, K.S.; Biscaia, S.M.; Chaim, O.M.; Otuki, M.F.; Naliwaiko, K.; Dombrowski, P.A.; Franco, C.R.; Veiga, S.S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: A pharmacological investigation. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *149*, 323–333.
150. Weisel-Eichler, A.; Libersat, F. Venom effects on monoaminergic systems. *J. Comp. Physiol. A Neuroethology Sens. Neural Behav. Physiol.* **2004**, *190*, 683–690.
151. Rattmann, Y.D.; Pereira, C.R.; Cury, Y.; Gremski, W.; Marques, M.C.; da Silva-Santos, J.E. Vascular permeability and vasodilation induced by the *Loxosceles intermedia* venom in rats: involvement of mast cell degranulation, histamine and 5-HT receptors. *Toxicon* **2008**, *51*, 363–372.
152. Gnanasekar, M.; Rao, K.V.; Chen, L.; Narayanan, R.B.; Geetha, M.; Scott, A.L.; Ramaswamy, K.; Kaliraj, P. Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *121*, 107–118.
153. MacDonald, S.M.; Bhisutthibhan, J.; Shapiro, T.A.; Rogerson, S.J.; Taylor, T.E.; Tembo, M.; Langdon, J.M.; Meshnick, S.R. Immune mimicry in malaria: *Plasmodium falciparum* secretes a

- functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10829–10832.
154. Rao, K.V.; Chen, L.; Gnanasekar, M.; Ramaswamy, K. Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31207–31213.
155. Efferth, T. Antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin—From bench to bedside. *Planta Med.* **2007**, *73*, 299.
156. Susini, L.; Besse, S.; Duflaut, D.; Lespagnol, A.; Beekman, C.; Fiucci, G.; Atkinson, A.R.; Busso, D.; Poussin, P.; Marine, J.C.; Martinou, J.C.; Cavarelli, J.; Moras, D.; Amson, R.; Telerman, A. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 1211–1220.
157. Gnanasekar, M.; Thirugnanam, S.; Zheng, G.; Chen, A.; Ramaswamy, K. Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2009**, *34*, 1241–1246.
158. Telerman, A.; Amson, R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 206–216.
159. Tuynder, M.; Fiucci, G.; Prieur, S.; Lespagnol, A.; Geant, A.; Beaucourt, S.; Duflaut, D.; Besse, S.; Susini, L.; Cavarelli, J.; Moras, D.; Amson, R.; Telerman, A. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15364–15369.
160. Slaby, O.; Sobkova, K.; Svoboda, M.; Garajova, I.; Fabian, P.; Hrstka, R.; Nenutil, R.; Sachlova, M.; Kocakova, I.; Michalek, J.; Smerdova, T.; Knoflickova, D.; Vyzula, R. Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncol. Rep.* **2009**, *21*, 1235–1241.
161. Ma, Q.; Geng, Y.; Xu, W.; Wu, Y.; He, F.; Shu, W.; Huang, M.; Du, H.; Li, M. The Role of Translationally Controlled Tumor Protein in Tumor Growth and Metastasis of Colon Adenocarcinoma Cells. *J. Proteome. Res.* **2009**, *9*, 40–49.
162. Tuynder, M.; Susini, L.; Prieur, S.; Besse, S.; Fiucci, G.; Amson, R.; Telerman, A. Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14976–14981.
163. Efferth, T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* **2005**, *8*, 85–97.
164. Kim, J.E.; Koo, K.H.; Kim, Y.H.; Sohn, J.; Park, Y.G. Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. *Exp. Mol. Med.* **2008**, *40*, 709–720.
165. van de Sande, W.W.; Janse, D.J.; Hira, V.; Goedhart, H.; van der Zee, R.; Ahmed, A.O.; Ott, A.; Verbrugh, H.; van Belkum, A. Translationally controlled tumor protein from *Madurella mycetomatis*, a marker for tumorous mycetoma progression. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 1997–2005.
166. Zhu, W.L.; Cheng, H.X.; Han, N.; Liu, D.L.; Zhu, W.X.; Fan, B.L.; Duan, F.L. Messenger RNA expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in liver regeneration and cancer. *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 1575–1580.
167. Rinnerthaler, M.; Jarolim, S.; Heeren, G.; Palle, E.; Perju, S.; Klinger, H.; Bogengruber, E.; Madeo, F.; Braun, R.J.; Breitenbach-Koller, L.; Breitenbach, M.; Laun, P. MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has

- apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1757*, 631–638.
168. Zanetti, V.C.; da Silveira, R.B.; Dreyfuss, J.L.; Haoach, J.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S.; Gremski, W. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2002**, *13*, 135–148.
169. Gomis-Rüth, F. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* **2003**, *24*, 157–202.
170. Sterchi, E.E. Special issue: Metzincin metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **2008**, *29*, 255–257.
171. Becker-Pauly, C.; Bruns, B.C.; Damm, O.; Schutte, A.; Hammouti, K.; Burmester, T.; Stocker, W. News from an ancient world: two novel astacin metalloproteases from the horseshoe crab. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 236–248.
172. Sarraz, M.P., Jr., BMP-1 and the astacin family of metalloproteinases: A potential link between the extracellular matrix, growth factors and pattern formation. *Bioessays* **1996**, *18*, 439–442.
173. Mohrlen, F.; Hutter, H.; Zwillig, R. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 4909–4920.
174. Bode, W.; Gomis-Ruth, F.X.; Stockler, W. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **1993**, *331*, 134–140.
175. Bond, J.S.; Beynon, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1247–1261.
176. Stocker, W.; Zwillig, R. Astacin. *Methods Enzymol.* **1995**, *248*, 305–325.
177. Stocker, W.; Bode, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: The metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 383–390.
178. Dumermuth, E.; Sterchi, E.E.; Jiang, W.P.; Wolz, R.L.; Bond, J.S.; Flannery, A.V.; Beynon, R.J. The astacin family of metalloendopeptidases. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21381–21385.
179. Sharma, V.K.; Teoh, H.L.; Wong, L.Y.; Su, J.; Ong, B.K.; Chan, B.P. Recanalization therapies in acute ischemic stroke: pharmacological agents, devices, and combinations. *Stroke Res. Treat.* **2010**, in press.
180. Gao, F.; Kiesewetter, D.; Chang, L.; Ma, K.; Rapoport, S.I.; Igarashi, M. Whole-body synthesis secretion of docosahexaenoic acid from circulating eicosapentaenoic acid in unanesthetized rats. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, 2463–2470.
181. Rash, L.D.; Hodgson, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. *Toxicon* **2002**, *40*, 225–254.
182. Nicholson, G.M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon* **2007**, *49*, 490–512.
183. De Lima, M.E.; Figueiredo, S.G.; Pimenta, A.M.; Santos, D.M.; Borges, M.H.; Cordeiro, M.N.; Richardson, M.; Oliveira, L.C.; Stankiewicz, M.; Pelhate, M. Peptides of arachnid venoms with insecticidal activity targeting sodium channels. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 264–279.
184. Sollod, B.L.; Wilson, D.; Zhaxybayeva, O.; Gogarten, J.P.; Drinkwater, R.; King, G.F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* **2005**, *26*, 131–139.

185. Grishin, E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 276–280.
186. Escoubas, P.; Diochot, S.; Corzo, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie* **2000**, *82*, 893–907.
187. Dutra, A.A.; Sousa, L.O.; Resende, R.R.; Brandao, R.L.; Kalapothakis, E.; Castro, I.M. Expression and characterization of LTx2, a neurotoxin from *Lasiadora* sp. effecting on calcium channels. *Peptides* **2008**, *29*, 1505–1513.
188. Norton, R.S.; Pallaghy, P.K. The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* **1998**, *36*, 1573–1583.
189. Schalle, J.; Kampfer, U.; Schurch, S.; Kuhn-Nentwig, L.; Haeberli, S.; Nentwig, W. CSTX-9, a toxic peptide from the spider *Cupiennius salei*: amino acid sequence, disulphide bridge pattern and comparison with other spider toxins containing the cystine knot structure. *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1538–1545.
190. Mouhat, S.; Jouirou, B.; Mosbah, A.; De Waard, M.; Sabatier, J.M. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 717–726.
191. Corzo, G.; Escoubas, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2409–2426.
192. Corzo, G.; Escoubas, P.; Stankiewicz, M.; Pelhate, M.; Kristensen, C.P.; Nakajima, T. Isolation, synthesis and pharmacological characterization of  $\delta$ -palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae). *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5783–5795.
193. Tedford, H.W.; Sollod, B.L.; Maggio, F.; King, G.F. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon* **2004**, *43*, 601–618.
194. Black, B.C.; Brennam, L.A.; Dierks, P.M.; Gard, I.E. Commercialization of baculoviral insecticides. In *The Baculoviruses* (Miller, Lois). In *The Viruses*; Plenum Press: New York, NY, USA, 1997; pp. 341–347.
195. Neurath, H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 268–271.
196. Otlewski, J.; Krowarsch, D.; Apostoluk, W. Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Pol.* **1999**, *46*, 531–565.
197. Rimphanitchayakit, V.; Tassanakajon, A. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. *Dev. Comp. Immunol.* **2010**, *34*, 377–386.
198. Laskowski, M., Jr.; Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 593–626.
199. Krowarsch, D.; Cierpicki, T.; Jelen, F.; Otlewski, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2427–2444.
200. Irving, J.A.; Pike, R.N.; Lesk, A.M.; Whisstock, J.C. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* **2000**, *10*, 1845–1864.
201. Law, R.H.; Zhang, Q.; McGowan, S.; Buckle, A.M.; Silverman, G.A.; Wong, W.; Rosado, C.J.; Langendorf, C.G.; Pike, R.N.; Bird, P.I.; Whisstock, J.C. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* **2006**, *7*, 216.
202. Takahashi, H.; Iwanaga, S.; Suzuki, T. Distribution of proteinase inhibitors in snake venoms. *Toxicon* **1974**, *12*, 193–197.



203. Shafqat, J.; Beg, O.U.; Yin, S.J.; Zaidi, Z.H.; Jornvall, H. Primary structure and functional properties of cobra (*Naja naja naja*) venom Kunitz-type trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 337–341.
204. Shafqat, J.; Zaidi, Z.H.; Jornvall, H. Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (*Naja naja naja*). *FEBS Lett.* **1990**, *275*, 6–8.
205. Chang, L.; Chung, C.; Huang, H.B.; Lin, S. Purification and characterization of a chymotrypsin inhibitor from the venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *283*, 862–867.
206. Chen, C.; Hsu, C.H.; Su, N.Y.; Lin, Y.C.; Chiou, S.H.; Wu, S.H. Solution structure of a Kunitz-type chymotrypsin inhibitor isolated from the elapid snake *Bungarus fasciatus*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45079–45087.
207. Lu, X.Z.; Zou, Y.G.; Yin, X.M.; Chen, W.T.; Zhang, C.P. Expression of MMP1 mRNA in oral squamous cell carcinoma and paired normal tissues. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2008**, *28*, 1362–1364.
208. Zhou, X.D.; Jin, Y.; Lu, Q.M.; Li, D.S.; Zhu, S.W.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L. Purification, characterization and primary structure of a chymotrypsin inhibitor from *Naja atra* venom. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *137*, 219–224.
209. He, D.; Natarajan, V.; Stern, R.; Gorshkova, I.A.; Solway, J.; Spannhake, E.W.; Zhao, Y. Lysophosphatidic acid-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E(2) release via C/EBPbeta in human bronchial epithelial cells. *Biochem. J.* **2008**, *412*, 153–162.
210. Millers, E.K.; Trabi, M.; Masci, P.P.; Lavin, M.F.; de Jersey, J.; Guddat, L.W., Crystal structure of textilinin-1, a Kunitz-type serine protease inhibitor from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*). *FEBS J.* **2009**, *276*, 3163–3175.
211. Flight, S.M.; Johnson, L.A.; Trabi, M.; Gaffney, P.; Lavin, M.; de Jersey, J.; Masci, P. Comparison of textilinin-1 with aprotinin as serine protease inhibitors and as antifibrinolytic agents. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **2005**, *34*, 188–193.
212. Flight, S.M.; Johnson, L.A.; Du, Q.S.; Warner, R.L.; Trabi, M.; Gaffney, P.J.; Lavin, M.F.; de Jersey, J.; Masci, P.P. Textilinin-1, an alternative anti-bleeding agent to aprotinin: Importance of plasmin inhibition in controlling blood loss. *Br. J. Haematol.* **2009**, *145*, 207–211.
213. Zhao, Y.; Jin, Y.; Wei, S.S.; Lee, W.H.; Zhang, Y. Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. *Toxicon* **2005**, *46*, 635–640.
214. Yuan, C.H.; He, Q.Y.; Peng, K.; Diao, J.B.; Jiang, L.P.; Tang, X.; Liang, S.P. Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas. *PLoS One* **2008**, *3*, e3414.
215. Duarte, M.M.; Montes De Oca, H.; Diniz, C.R.; Fortes-Dias, C.L. Primary culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* **1999**, *37*, 1673–1682.
216. Yamanouye, N.; Kerchove, C.M.; Moura-da-Silva, A.M.; Carneiro, S.M.; Markus, R.P. Long-term primary culture of secretory cells of *Bothrops jararaca* venom gland for venom production in vitro. *Nat. Protocols* **2007**, *1*, 2763–2766.

217. Silva, L.M.; Lages, C.P.; Venuto, T.; Lima, R.M.; Diniz, M.V.; Valentim, C.L.L.; Baba, E.H.; Pimenta, P.F.P.; Fortes-Dias, C.L. Primary culture of venom glands from the Brazilian armed spider, *Phoneutria nigriventer* (Araneae, Ctenidae). *Toxicon* **2008**, *51*, 428–434.
218. Domingos, M.O.; Barbaro, K.C.; Tynan, W.; Penny, J.; Lewis, D.J.; New, R.R. Influence of sphingomyelin and TNF-alpha release on lethality and local inflammatory reaction induced by *Loxosceles gaucho* spider venom in mice. *Toxicon* **2003**, *42*, 471–479.
219. Barbaro, K.C.; Lira, M.S.; Araujo, C.A.; Pareja-Santos, A.; Tavora, B.C.; Prezotto-Neto, J.P.; Kimura, L.F.; Lima, C.; Lopes-Ferreira, M.; Santoro, M.L. Inflammatory mediators generated at the site of inoculation of *Loxosceles gaucho* spider venom. *Toxicon* **2010**, *56*, 972–979.
220. Burgess, R.R.; Richard, R.B.; Murray, P.D. Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Salt Lake City, UT, USA, 2009; Volume 463, Chapter. 17, pp. 259–282.
221. Daly, R.; Hearn, M.T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 119–138.
222. Benting, J.; Lecat, S.; Zacchetti, D.; Simons, K. Protein Expression in *Drosophila Schneider* Cells. *Anal. Biochem.* **2000**, *278*, 59–68.
223. Rohrmann, G.F. *Baculovirus Molecular Biology*, European Molecular Biology Organization: Corvallis, OR, USA, 2008.
224. Wurm, F.M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat. Biotech.* **2004**, *22*, 1393–1398.
225. Escoubas, P.; Sollod, B.; King, G.F. Venom landscapes: Mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon* **2006**, *47*, 650–663.
226. Murakami, M.T.; Fernandes-Pedrosa, M.F.; Tambourgi, D. V.; Arni, R.K. Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13658–13664.

## Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom

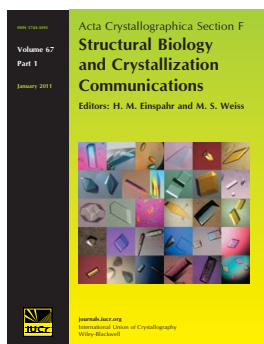
Anwar Ullah, Priscila Oliveira de Giuseppe, Mario Tyago Murakami, Dilza Trevisan-Silva, Ana Carolina Martins Wille, Daniele Chaves-Moreira, Luiza Helena Gremski, Rafael Bertoni da Silveira, Andrea Sennf-Ribeiro, Olga Meiri Chaim, Silvio Sanches Veiga and Raghuvir Krishnaswamy Arni

*Acta Cryst.* (2011). **F67**, 234–236

Copyright © International Union of Crystallography

Author(s) of this paper may load this reprint on their own web site or institutional repository provided that this cover page is retained. Republication of this article or its storage in electronic databases other than as specified above is not permitted without prior permission in writing from the IUCr.

For further information see <http://journals.iucr.org/services/authorrights.html>



*Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* is a rapid all-electronic journal, which provides a home for short communications on the crystallization and structure of biological macromolecules. It includes four categories of publication: protein structure communications; nucleic acid structure communications; structural genomics communications; and crystallization communications. Structures determined through structural genomics initiatives or from iterative studies such as those used in the pharmaceutical industry are particularly welcomed. *Section F* is essential for all those interested in structural biology including molecular biologists, biochemists, crystallization specialists, structural biologists, biophysicists, pharmacologists and other life scientists.

Crystallography Journals **Online** is available from [journals.iucr.org](http://journals.iucr.org)

Anwar Ullah,<sup>a</sup> Priscila Oliveira de Giuseppe,<sup>b</sup> Mario Tyago Murakami,<sup>b</sup> Dilza Trevisan-Silva,<sup>c</sup> Ana Carolina Martins Wille,<sup>c,d</sup> Daniele Chaves-Moreira,<sup>c</sup> Luiza Helena Gremski,<sup>c</sup> Rafael Bertoni da Silveira,<sup>c,d</sup> Andrea Sennf-Ribeiro,<sup>c</sup> Olga Meiri Chaim,<sup>c</sup> Silvio Sanches Veiga<sup>c</sup> and Raghuvir Krishnaswamy Arni<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 15054-000 São José do Rio Preto-SP, Brazil, <sup>b</sup>Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, 13083-970 Campinas-SP, Brazil,

<sup>c</sup>Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, 81531-960 Curitiba-PR, Brazil, and

<sup>d</sup>Departamento de Biologia Estrutural, Biologia Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 84030-900 Ponta Grossa-PR, Brazil

Correspondence e-mail: arni@sjrp.unesp.br

Received 14 October 2010

Accepted 4 December 2010



© 2011 International Union of Crystallography  
All rights reserved

## Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom

Phospholipases D are the major dermonecrotic component of *Loxosceles* venom and catalyze the hydrolysis of phospholipids, resulting in the formation of lipid mediators such as ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid which can induce pathological and biological responses. Phospholipases D can be classified into two classes depending on their catalytic efficiency and the presence of an additional disulfide bridge. In this work, both wild-type and H12A-mutant forms of the class II phospholipase D from *L. intermedia* venom were crystallized. Wild-type and H12A-mutant crystals were grown under very similar conditions using PEG 200 as a precipitant and belonged to space group *P*12<sub>1</sub>1, with unit-cell parameters *a* = 50.1, *b* = 49.5, *c* = 56.5 Å,  $\beta$  = 105.9°. Wild-type and H12A-mutant crystals diffracted to maximum resolutions of 1.95 and 1.60 Å, respectively.

### 1. Introduction

Envenomation by members of the genus *Loxosceles* (brown spiders), considered to be the most dangerous form of arachnidism, is a serious public health problem in both North and South America (Santi Ferrara *et al.*, 2009). *Loxosceles* venom can cause local dermonecrosis with gravitational spreading and systemic manifestations such as thrombocytopaenia, haemolysis and acute renal failure that can lead to death (Futrell, 1992; da Silva *et al.*, 2004).

Several toxic proteins present in *Loxosceles* spp. venoms have been identified and biochemically characterized (da Silva *et al.*, 2004; Gremski *et al.*, 2010). Members of the phospholipase D family are abundant in the venoms of several *Loxosceles* spp. and contribute significantly to the typical response after envenomation (Kalapothakis *et al.*, 2007; Sennf-Ribeiro *et al.*, 2008).

Phospholipases D (30–35 kDa), also referred to as dermonecrotic toxins, catalyze the hydrolysis of sphingomyelin and (lyso) glycerophospholipids, resulting in the formation of bioactive mediators such as ceramide-1-phosphate and lysophosphatidic acid which play a role in several pathological and biological responses (Van Meeteren *et al.*, 2004; Moolenaar *et al.*, 2004; Lee & Lynch, 2005). As proposed by Murakami *et al.* (2006), spider-venom phospholipases D can be classified into two classes. Members of class I possess a single disulfide bridge and contain an extended hydrophobic loop, whereas class II proteins contain an additional intra-chain disulfide bridge and display decreased catalytic activity towards phospholipids. To date, only the phospholipase D from *L. laeta* venom, a member of class I, has been structurally characterized (Murakami *et al.*, 2005), despite the clinical importance of phospholipases D in loxoscelism. Based on its crystal structure, an acid–base catalytic mechanism was proposed in which His12 and His47 play key roles and are supported by a network of hydrogen bonds between Asp34, Asp52, Trp230, Asp233 and Asn252 (Murakami *et al.*, 2005).

The recombinant dermonecrotic toxin (LiRecDT1) obtained from a cDNA library of the *L. intermedia* venom gland is able to directly induce renal injuries in mice and the haemolysis of human erythrocytes *in vitro*, suggesting that this protein is directly involved in the

the nephrotoxicity and haematological disturbances evoked during envenomation by *Loxosceles* spiders (Chaim *et al.*, 2006; Chaves-Moreira *et al.*, 2009). Mutation of the catalytic residue His12 to Ala abolishes both the nephrotoxic effect of LiRecDT1 in mice and the haemolysis of human erythrocytes (Kusma *et al.*, 2008; Chaves-Moreira *et al.*, 2009).

The present report describes the crystallization and preliminary crystallographic analysis of recombinant wild-type (LiRecDT1) and mutant (LiRecDT1 H12A) dermonecrotic toxin from *L. intermedia* venom, which belongs to the class II phospholipases D. The structural characterization of LiRecDT1 will be essential to shed light on the structural determinants of the functional differentiation between members of the class I and class II phospholipases D.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Expression and purification

DNA corresponding to the wild-type (LiRecDT1) and mutated (LiRecDT1 H12A) forms of the mature phospholipase D was cloned into pET-14b vector (Novagen, Madison, USA) as described by Chaim *et al.* (2006) and Kusma *et al.* (2008). Both recombinant constructs were expressed as fusion proteins with a 6×His tag at the N-terminus and a 13-amino-acid linker including a thrombin site between the 6×His tag and the mature protein. pET-14b/*L. intermedia* cDNA constructs were transformed into One Shot *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS competent cells (Invitrogen) and plated on LB agar plates containing 100 mg ml<sup>-1</sup> ampicillin and 34 mg ml<sup>-1</sup> chloramphenicol. A single colony was inoculated into 50 ml LB broth (plus antibiotics) and allowed to grow overnight at 310 K. A 10 ml

portion of this overnight culture was grown in 1 l LB broth/ampicillin/chloramphenicol at 310 K until the OD at 550 nm reached 0.5. IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) was added to a final concentration of 0.05 mM and the culture was induced by incubation for an additional 3.5 h at 303 K. Cells were harvested by centrifugation (400g, 7 min) and the pellet was frozen at 253 K overnight.

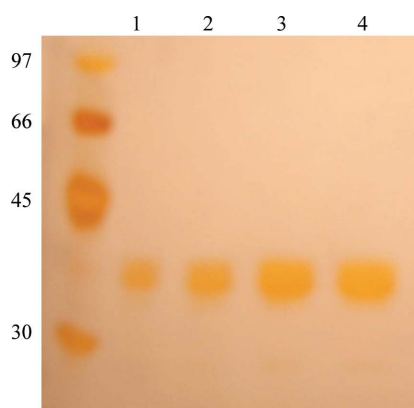
The cell suspensions were thawed and were additionally disrupted by six 10 s cycles of sonication at low intensity. The lysed materials were centrifuged (20 000g, 20 min) and the supernatants were incubated with 1 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose beads for 1 h at 277 K (with gentle agitation). The suspensions were loaded onto a column and the packed gel was exhaustively washed with 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole until the OD at 280 nm reached 0.01. The recombinant proteins were eluted with 10 ml elution buffer (50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole) and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 1). The fractions were pooled and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS). Site-directed mutagenesis did not alter the correct folding of the brown spider phospholipase D as assessed by circular-dichroism and fluorescence experiments (results not shown).

### 2.2. Crystallization

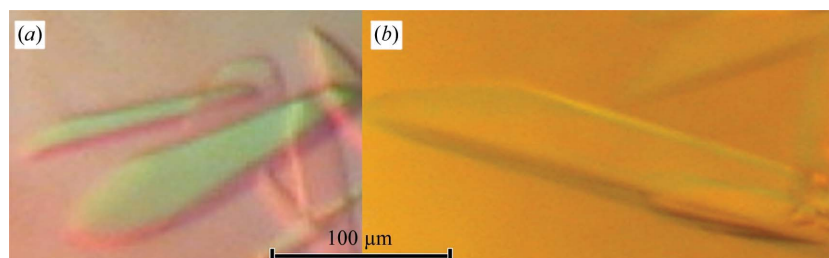
The wild-type and mutant proteins were initially crystallized by vapour diffusion in sitting drops using a Cartesian HoneyBee 963 system (Genomic Solutions) at 291 K. For initial screening, 1 µl protein solution at a concentration of 17 mg ml<sup>-1</sup> for the wild type and of 9 mg ml<sup>-1</sup> for the H12A mutant was mixed with 1 µl screening solution and equilibrated over a reservoir containing 100 µl of the latter solution. Small crystals of wild-type LiRecDT1 were observed in the condition 0.1 M Tris-HCl pH 8, 35%(v/v) PEG 200, which was refined by varying the PEG 200 concentration *versus* the pH using the hanging-drop method. The best wild-type LiRecDT1 crystals were observed in drops consisting of 2 µl protein solution (17 mg ml<sup>-1</sup>) and 2 µl reservoir solution equilibrated over 1 ml reservoir solution [0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 40%(v/v) PEG 200] (Fig. 2a). Crystals of the H12A mutant were grown in a very similar condition consisting of 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 and 35%(v/v) PEG 200 (Fig. 2b).

### 2.3. X-ray diffraction analysis

LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A crystals were directly flash-cooled in a 100 K nitrogen-gas stream. X-ray diffraction data were collected on the W01B-MX2 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (Campinas, Brazil). The LiRecDT1 crystal was exposed for 60 s per 2° rotation in  $\phi$  with the crystal-to-detector distance set to 100 mm. The LiRecDT1 H12A crystal was exposed for 20 s per 1° rotation in  $\phi$  with the crystal-to-detector set to 69 mm. A total of 180 and 300 images were collected from the LiRecDT1 and the LiRecDT1 H12A crystals, respectively. The data were indexed,



**Figure 1**  
Silver-stained SDS-PAGE (12%) of purified samples of wild-type and H12A-mutant dermonecrotic toxin from *L. intermedia*. Lane 1, molecular-weight markers (kDa); lanes 2 and 4, purified LiRecDT1 (18 and 34 µg, respectively); lanes 3 and 5, purified LiRecDT1 H12A (18 and 34 µg, respectively).



**Figure 2**  
Microphotograph of crystals of (a) wild-type and (b) mutant dermonecrotic toxin from *L. intermedia*.

**Table 1**

Data-collection statistics.

Values in parentheses are for the last resolution shell.

	LiRecDT1	LiRecDT1 H12A
Data collection		
Temperature (K)	100	100
Radiation source	Brazilian Synchrotron Light Laboratory	Brazilian Synchrotron Light Laboratory
Beamline	W01B-MX2	W01B-MX2
Wavelength (Å)	1.458	1.458
Detector	MAR Mosaic 225 mm	MAR Mosaic 225 mm
Space group	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1	<i>P</i> 12 <sub>1</sub> 1
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> = 50.08, <i>b</i> = 49.43, <i>c</i> = 56.59, $\beta$ = 105.88	<i>a</i> = 49.58, <i>b</i> = 49.46, <i>c</i> = 56.40, $\beta$ = 105.56
Resolution range (Å)	30.0–2.0 (2.07–2.00)	30.0–1.60 (1.66–1.60)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)†	12.1 (49.4)	7.3 (37.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	9.3 (2.4)	19.5 (2.9)
Data completeness (%)	99.5 (98.1)	98.9 (92.4)
No. of unique reflections	18148 (1765)	34632 (3241)
Multiplicity	3.1 (2.7)	5.1 (3.3)
Data analysis		
<i>V</i> <sub>M</sub> (Å <sup>3</sup> Da <sup>−1</sup> )	2.25	2.22
Solvent content (%)	45.25	44.63
Molecules per asymmetric unit	1	1

†  $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , where  $I_i(hkl)$  is the *i*th observation of reflection *hkl* and  $\langle I(hkl) \rangle$  is the weighted average intensity for all observations *I* of reflection *hkl*.

integrated and scaled using the *DENZO* and *SCALEPACK* programs from the *HKL-2000* package (Otwinowski & Minor, 1997). Data-processing statistics are summarized in Table 1.

### 3. Results and discussion

LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A crystals diffracted to resolutions of 1.95 and 1.60 Å, respectively. Although the mutant protein crystal diffracted better than the native protein crystal, the H12A mutation did not alter the crystal packing or the unit-cell symmetry and parameters. The LiRecDT1 and LiRecDT1 H12A data sets were indexed in the monoclinic crystal system. The presence of systematic absences indicated that the crystals belonged to space group *P*12<sub>1</sub>1. Both crystals possessed highly similar unit-cell parameters (Table 1). The Matthews coefficient calculated for the LiRecDT1 crystal was 2.25 Å<sup>3</sup> Da<sup>−1</sup>, corresponding to a solvent content of 45% (Matthews, 1968). Considering the molecular weight of 30 000 Da, one molecule is present in the asymmetric unit of both crystals. Data-processing statistics for both data sets are presented in Table 1.

The atomic coordinates of the phospholipase D from *L. laeta* venom (PDB code 1xx1; Murakami *et al.*, 2005), which displays a sequence identity of 58% with LiRecDT1, were used to generate a search model and molecular-replacement calculations were carried out using the program *MOLREP* in the resolution range 15.0–3.0 Å (Vagin & Teplyakov, 2010). A solution was obtained for one molecule in the asymmetric unit in space group *P*12<sub>1</sub>1. Analysis of the packing

contacts and steric clashes clearly showed that this was the correct solution. *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 1997) was used for rigid-body refinement of this solution in the resolution range 30.0–1.95 Å (excluding 5% of reflections for *R*<sub>free</sub> calculations), resulting in a correlation coefficient of 49.2, a score of 0.675 (the score of the next highest peak was 0.338) and an *R* factor of 45.6% (*R*<sub>free</sub> = 49.1%). Structure refinement and analysis are currently in progress. Determination of the LiRecDT1 H12A crystal structure will be performed using the final model of wild-type LiRecDT1.

This work was supported by grants from Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, TWAS, FAPESP, CNPq and CAPES-Brazil.

### References

- Chaim, O. M., Sade, Y. B., da Silveira, R. B., Toma, L., Kalapothakis, E., Chávez-Olortegui, C., Mangili, O. C., Gremski, W., von Dietrich, C. P., Nader, H. B. & Veiga, S. S. (2006). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **211**, 64–77.
- Chaves-Moreira, D., Chaim, O. M., Sade, Y. B., Paludo, K. C., Gremski, L. H., Donatti, L., de Moura, J., Mangili, O. C., Gremski, W., da Silveira, R. B., Senff-Ribeiro, A. & Veiga, S. S. (2009). *J. Cell. Biochem.* **107**, 655–666.
- da Silva, P. H., da Silveira, R. B., Appel, M. H., Mangili, O. C., Grewski, W. & Veiga, S. S. (2004). *Toxicol.* **44**, 693–709.
- Futrell, J. M. (1992). *Am. J. Med. Sci.* **304**, 261–267.
- Gremski, L. H., da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Probst, C. M., Ferrer, V. P., Nowatzki, J., Weinschutz, H. C., Madeira, H. M., Gremski, W., Nader, H. B., Senff-Ribeiro, A. & Veiga, S. S. (2010). *Mol. Biosyst.* **6**, 2403–2416.
- Kalapothakis, E., Chatzaki, M., Gonçalves-Dornelas, H., de Castro, C. S., Silvestre, F. G., Laborne, F. V., de Moura, J. F., Veiga, S. S., Chávez-Olortegui, C., Granier, C. & Barbaro, K. C. (2007). *Toxicol.* **50**, 938–946.
- Kusma, J., Chaim, O. M., Wille, A. C., Ferrer, V. P., Sade, Y. B., Donatti, L., Gremski, W., Mangili, O. C. & Veiga, S. S. (2008). *Biochimie*, **90**, 1722–1736.
- Lee, S. & Lynch, K. R. (2005). *Biochem. J.* **391**, 317–323.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Meeteren, L. A. van, Frederiks, F., Giepmans, B. N., Pedrosa, M. F., Billington, S. J., Jost, B. H., Tambourgi, D. V. & Moolenaar, W. H. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 10833–10836.
- Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A. & Giepmans, B. N. (2004). *Bioessays*, **26**, 870–881.
- Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., de Andrade, S. A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D. V. & Arni, R. K. (2006). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 323–329.
- Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., Tambourgi, D. V. & Arni, R. K. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 13658–13664.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). *Acta Cryst.* **D53**, 240–255.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol.* **276**, 307–326.
- Santi Ferrara, G. I. de, Fernandes-Pedrosa, M. F., Junqueira-de-Azevedo, I. L. M., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Portaro, F. C. V., Manzoni-de-Almeida, D. M., Murakami, M. T., Arni, R. K., van den Berg, C. W., Ho, P. L. & Tambourgi, D. V. (2009). *Toxicol.* **53**, 743–753.
- Senff-Ribeiro, A., Henrique da Silva, P., Chaim, O. M., Gremski, L. H., Paludo, K. S., Bertoni da Silveira, R., Gremski, W., Mangili, O. C. & Veiga, S. S. (2008). *Biotechnol. Adv.* **26**, 210–218.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.





## Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge

Priscila Oliveira de Giuseppe<sup>a,1</sup>, Anwar Ullah<sup>b,1</sup>, Dilza Trevisan Silva<sup>c</sup>, Luiza Helena Gremski<sup>c</sup>, Ana Carolina Martins Wille<sup>c,d</sup>, Daniele Chaves Moreira<sup>c</sup>, Andrea Senff Ribeiro<sup>c</sup>, Olga Meiri Chaim<sup>c</sup>, Mario Tyago Murakami<sup>a</sup>, Silvio Sanches Veiga<sup>c</sup>, Raghuvir Krishnaswamy Arni<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, 13083-970 SP, Brazil

<sup>b</sup> Centro Multiusuário de Inovação Biomolecular, Departamento de Física, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 15054-000 SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 80060-000 PR, Brazil

<sup>d</sup> Department of Structural, Molecular Biology and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 April 2011

Available online 17 May 2011

#### Keywords:

*Loxosceles* spider venom

Phospholipase D

Crystal structure

### ABSTRACT

Phospholipases D (PLDs) are principally responsible for the local and systemic effects of *Loxosceles* envenomation including dermonecrosis and hemolysis. Despite their clinical relevance in loxoscelism, to date, only the SMase I from *Loxosceles laeta*, a class I member, has been structurally characterized. The crystal structure of a class II member from *Loxosceles intermedia* venom has been determined at 1.7 Å resolution. Structural comparison to the class I member showed that the presence of an additional disulphide bridge which links the catalytic loop to the flexible loop significantly changes the volume and shape of the catalytic cleft. An examination of the crystal structures of PLD homologues in the presence of low molecular weight compounds at their active sites suggests the existence of a ligand-dependent rotamer conformation of the highly conserved residue Trp230 (equivalent to Trp192 in the glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Thermus thermophilus*, PDB code: 1VD6) indicating its role in substrate binding in both enzymes. Sequence and structural analyses suggest that the reduced sphingomyelinase activity observed in some class IIb PLDs is probably due to point mutations which lead to a different substrate preference.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Envenomation by brown spiders (*Loxosceles* spp.) leads to a strong local dermonecrotic effect (cutaneous loxoscelism) and systemic manifestations, whose symptoms include hematuria, hemoglobinuria, jaundice and fever [1–3]. Although, the systemic loxoscelism occurs in a minority of cases, it can be fatal, especially in children [1–3].

Phospholipases D (PLD) are considered the main components responsible for the local and systemic effects of *Loxosceles* venom including dermonecrosis, renal toxicity and hemolysis [4–9]. *Loxosceles* PLDs (30–35 kDa), also referred to as dermonecrotic toxins, were primarily designated as sphingomyelinases D (SMases D) due to their ability to convert sphingomyelin to choline and ceramide 1-phosphate (*N*-acylsphingosine 1-phosphate) [4]. As some *Loxosceles* PLDs have broad substrate specificity, being able

to hydrolyze not only sphingophospholipids but also lysoglycerophospholipids, they are now classified as phospholipases D [10–12].

PLDs can be grouped into two classes based on sequence, structural and biochemical data [13]. The class I, represented by PLD I from *Loxosceles laeta*, is characterized by the presence of a single disulphide bridge (Cys51–Cys57) and an extended hydrophobic loop (variable loop). Class II comprises PLDs that contain an additional intra-chain disulphide bridge linking the flexible loop and the catalytic loop. Depending on their ability to hydrolyze sphingomyelin, they are further subdivided into classes IIa (more active) and IIb (less active or inactive), respectively [13].

Despite the clinical importance of these enzymes in loxoscelism, to date, only the PLD I from *L. laeta*, a class I member, had been structurally characterized [14]. Based on its crystal structure, an acid-base catalytic mechanism was proposed, where His12 and His47 play key roles and are supported by a network of hydrogen bonds between Asp34, Asp52, Trp230, Asp233, and Asn252 [14]. However, the vast majority of *Loxosceles* PLDs belongs to the class II, and none of their three-dimensional structures have been determined. A representative member of class II PLD is the dermonecrotic toxin isoform 1 from *Loxosceles intermedia* [11]. The recombinant protein

\* Corresponding author.

E-mail address: [arni@ibilce.unesp.br](mailto:arni@ibilce.unesp.br) (R.K. Arni).

<sup>1</sup> Both authors have contributed equally to this work.

(LiRecDT1) is able to hydrolyze sphingomyelin and presents dermonecrotic and hemolytic activities, characteristics of the whole venom [10,11,15,16]. Moreover, LiRecDT1 is able to directly induce renal injuries in mice and its nephrotoxic effects are dependent on its catalytic activity [11]. It has also been demonstrated that LiRecDT1 released choline from endothelial and kidney cell membrane extracts and bound to various lipids, such as sphingomyelin, lyso-phosphatidylcholine and cholesterol [12].

This work presents the first crystal structure of a *Loxosceles* venom class II PLD, the dermonecrotic toxin isoform 1 from *L. intermedia*. A comparison of the three-dimensional structures of class I and II PLDs, indicates the effect of an additional disulfide bridge which links the surface loops on the volume and shape of the catalytic cleft. Sequence and structural analyses suggest that the reduced or absent sphingomyelinase activity of some class IIb PLDs [15,17,18] is probably due to mutations of amino acid residues affecting substrate affinity or protein stability, since all catalytically-relevant residues are fully conserved. Moreover, the mutations observed at the catalytic pocket of these proteins are the same encountered in the active PLD 2 from *L. laeta* [19].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Expression and purification

Mature dermonecrotic toxin isoform 1 from *L. intermedia* (LiRecDT1) was cloned into a pET-14b vector (Novagen, Madison, USA) and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS cells (Invitrogen) as described previously [20]. Expression was induced by the addition of 0.05 mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside) during 3.5 h at 303 K after the cell culture had reached an OD<sub>550</sub> of 0.5.

Cell suspension was disrupted by six 10 s-cycles of sonication. Lysed material was centrifuged (20,000g, 20 min) and the supernatant was incubated with 1 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose beads for 1 h at 277 K. The suspensions were loaded onto a column and the packed gel was washed with 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole. The recombinant protein was eluted with 10 ml of the above buffer which additionally contained 250 mM imidazole and 1 ml fractions were collected and analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Fractions were pooled and dialyzed against phosphate buffer saline (PBS).

### 2.2. Crystallization

The LiRecDT1 protein was crystallized by vapor diffusion in sitting drops using a Cartesian HoneyBee 963 system (Genomic Solutions) at 291 K as described in [20]. Optimal crystals were observed in drops containing 2  $\mu$ l of the protein solution (17 mg ml<sup>-1</sup>) and 2  $\mu$ l of the reservoir solution equilibrated over 1 ml of reservoir solution (0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 40% (v/v) PEG200).

### 2.3. Data collection and processing

LiRecDT1 crystals were directly flash-cooled in a 100 K nitrogen-gas stream. X-ray diffraction data were collected on the W01B-MX2 beamline at the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (Campinas, Brazil) as described in earlier [20]. The data were indexed, integrated and scaled using the DENZO and SCALEPACK programs from the HKL-2000 package [21]. Data collection and refinement statistics are summarized in Table 1.

### 2.4. Structure solution and refinement

The initial structural model of LiRecDT1 was determined by molecular-replacement using the program MOLREP [22] and the

**Table 1**

Data collection and refinement statistics.

Data collection <sup>a</sup>	
Temperature (K)	100
Radiation source	W01B-MX2 (LNLS, Brazil)
Wavelength (Å)	1.458
Detector	MarMosaic 225
Space group	P12 <sub>1</sub> 1
Unit-cell parameters (Å, °)	$a = 49.81$ , $b = 49.30$ and $c = 56.30$ ; $\beta = 105.83$
Resolution range (Å)	24.65–1.72 (1.81–1.72)
$R_{\text{merge}}$ <sup>b</sup> (%)	9.7 (46.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.1 (2.0)
Data completeness (%)	99.9 (99.9)
No. of measured reflections	102,021 (14,085)
No. of unique reflections	28,041 (4040)
Multiplicity	3.6 (3.5)
Structure refinement statistics	
$R_{\text{factor}}$	17.2
$R_{\text{free}}$	21.4
r.m.s.d. Bond distances (Å)	0.023
r.m.s.d. Bond angles (°)	1.930
Ramachandran outliers (%)	0
Ramachandran favored (%)	99.3
Average B-factors (Å <sup>2</sup> )	17.74

<sup>a</sup> Values in parentheses are for the last resolution shell.

<sup>b</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , where  $I_i(hkl)$  is the  $i$ th observation of reflection  $hkl$  and  $\langle I(hkl) \rangle$  is the weighted average intensity for all observations  $I$  of reflection  $hkl$ .

atomic coordinates of PLD 1 from *L. laeta* as the template (PDB code 1XX1; [14]). Model refinement was carried out alternating cycles of REFMAC5 [23] with visual inspection of the electron density maps and manual rebuilding with COOT [24]. A total of 278 residues were modeled, comprising LiRecDT1 residues from Gly2 to Lys284, numbered according to the class I phospholipase D structure (PDB code 1XX1; [14]). Water molecules were added using COOT [24] during the last refinement cycles. One magnesium ion (Mg<sup>2+</sup>), two ethylene glycol (EDO), four diethylene glycol (PEG) and one triethylene glycol (PGE) were modeled based on the difference Fourier map of LiRecDT1. The final model consists of one monomer and was established after the convergence of  $R_{\text{factor}}$  and  $R_{\text{free}}$  values to 17.2% and 21.4%, respectively. Analyses of monomer–monomer interfaces using the PISA web server [25] did not indicate any biologically relevant quaternary structure in the crystal. Stereochemistry of the model was analyzed with Molprobity [26]. No outlier was observed in the Molprobity Ramachandran plot and more than 99% of the residues are in its favored region. Data collection and structure refinement statistics are summarized in Table 1. Figures were produced using the program Py-mol [27].

### 2.5. Molecular modeling and quality analysis

The atomic coordinates of LiRecDT1 (PDB code: 3RLH) was used as the initial model to obtain three-dimensional models of LiRecDT3 from *L. intermedia* (ABB71184.1) and Lb3 from *L. boneti* (AAT66074.1), using the modeling option of the Swiss-Model server [28]. For energy minimization, the final models were submitted under explicit solvent molecular dynamics (MD) simulations using YASARA until the convergence of root mean square deviation (r.m.s.d.) (Fig. S1). The overall and local quality analysis of the final model was assessed by ProSA-web [29] and Molprobity [26]. More than 99% of the residues of both models are in the favored region of the Ramachandran plot. ProSA-web analyses indicated that the referred models present Z-scores within the range typically observed for native proteins of similar size.



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Overall structure

LiRecDT1 is a single domain protein which folds into a TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>-barrel with the insertion of additional  $\beta$ -strands and  $\alpha$ -helices (Fig. 1). FastSCOP [30] analysis indicates that this class II PLD belongs to the phospholipase C (PLC) like phosphodiesterases superfamily, suggesting that PLDs share a common ancestor with PLC like domains encountered in mammalian phospholipase C isozyme D1 [30], bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C [31] and glycerophosphodiester phosphodiesterases [32].

The catalytic (blue), variable (green), flexible (red) and other short loops surround the active site cleft (Fig. 1). The catalytic loop, which contains the catalytically important residue, His47, forms a hairpin due to the presence of a disulphide bridge (Cys51–Cys57). A network of hydrogen bonds ensures the correct relative orientation of the hairpin in relation to the core of the protein.

#### 3.2. Structural comparison between class I and II phospholipases D

LiRecDT1 superimposes on the class I PLD from *L. laeta* (SMase I) (PDB code: 1XX1; [19]) with a r.m.s. deviation of 0.938 Å for 268 C $\alpha$  atoms and a sequence identity of 61.6 %. The main conformational changes are observed at the flexible and variable loops (Fig. 1). LiRecDT1 possesses a disulfide bridge between Cys53 and Cys201, which causes a large displacement of the flexible loop towards the catalytic loop (Fig. 1). This disulfide bridge is well conserved in class II PLDs, but absent in class I PLD due to the mutation C201F (Fig. 2).

Regarding the variable loop, a five-residue insertion (YLPSL), which protrudes from the core structure of class I PLD, is absent in the class II PLD (Figs. 1 and 2). Moreover, the three last residues that compose the variable loop are not conserved between class I and class II PLDs (Fig. 2). The mean *B*-factors for the main-chain atoms of the variable loops are 26.39 Å<sup>2</sup> and 15.86 Å<sup>2</sup> for class I (PDB code: 1XX1, chain A) and class II respectively, indicating that the class I variable loop is significantly more flexible than that of class II.

In the class II PLD, the flexible loop is displaced towards the catalytic loop and partially occludes an electronegative cleft that leads to the active site in the class I PLD (Fig. 3). This results in a volumetric reduction of the cavity that forms the catalytic site of the class II PLD. Based on SURFNET analysis [33], the volume and average depth of the cleft observed at the class I PLD catalytic face are 4339.4 Å<sup>3</sup> and 15.2 Å, respectively. These values are considerably larger than those estimated for the corresponding cavity at the class II PLD (volume 1468.1 Å<sup>3</sup>, average depth 10.1 Å). Besides the lack of the disulfide bridge connecting the catalytic and flexible loops, the protrusion of variable loop and the substitution N137G also account for the enlargement of the cleft surrounding the catalytic site of the class I PLD (Fig. 3).

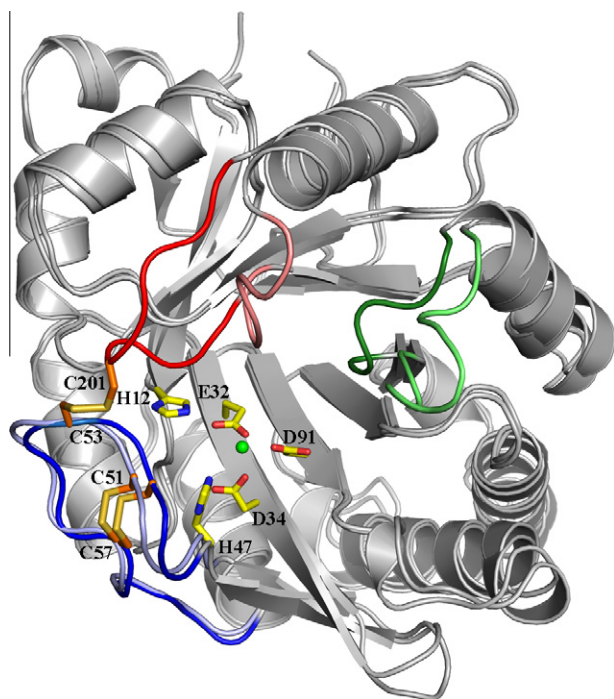
A large electronegative patch, which includes the variable loop, is observed surrounding the right side of the class II PLD catalytic pocket. However, in the class I PLD, this patch is interrupted by the longer variable loop that forms a protrusion with neutral potential (Fig. 3). Interestingly, an electronegative cleft, hidden by the neutral catalytic and flexible loops in the class II PLD, is exposed in the class I PLD, due to the absence of a disulfide bridge connecting these loops. Thus, in the class I PLD the impairment in the electronegative potential of a patch at the right side of the catalytic pocket seems to be compensated by the exposure of another electronegative patch on the left side.

Together, these differences observed in the topography and electrostatic potential distribution of class I and II PLDs catalytic faces suggest that these enzymes might have different ways to guide the substrate into the catalytic pocket.

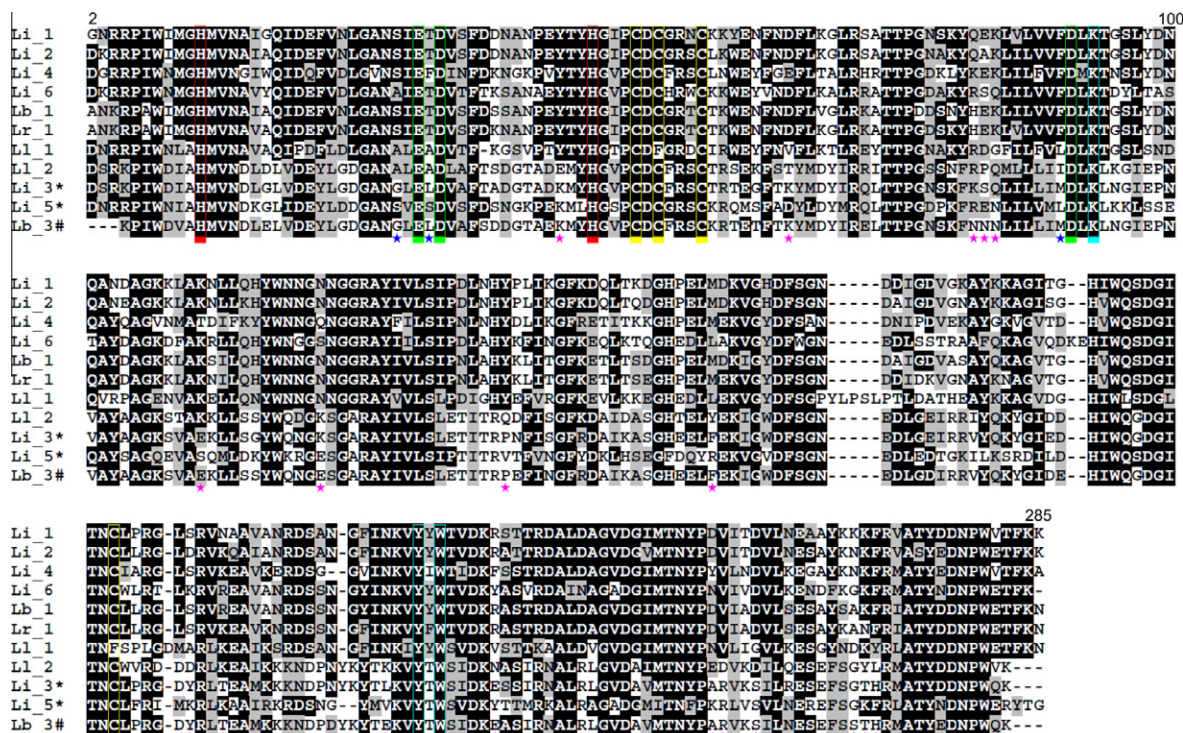
#### 3.3. Active site

The Mg<sup>2+</sup> binding site and the two catalytic histidine residues (His12 and His47), which compose the active-site pocket are strictly conserved in both classes of spider venom PLDs (Fig. 2). Interestingly, at the active site of LiRecDT1, the difference Fourier map contained residual density. However, neither substrates nor products could account for this density. This residual density was modeled as two PEG molecules with partial occupancy.

In the LiRecDT1 structure, the Mg<sup>2+</sup> ion (*B* factor of 14.26 Å<sup>2</sup> and a mean Mg–O bond distance of 2.1 Å) is hexacoordinated by the carboxyl oxygens of Glu32, Asp34, Asp91, one water molecule and two PEG4 oxygens. The same geometric coordination is observed for the Mg<sup>2+</sup> ion in class I PLD structure bound to a sulfate ion [13]. As pointed out earlier, *Loxosceles* PLDs and glycerophosphodiester phosphodiesterases (GDPDs) share a similar divalent metal dependent catalytic mechanism and probably evolved from a common ancestor [14]. In spite of their different specificities, structural comparisons of the PLD and GDPD active sites suggest that they share not only residues involved in metal binding and catalysis but also in substrate binding such as Lys93 and Trp230 (Fig. 4A). Murakami et al. have suggested a role for Lys93 and Trp230 in the orientation of the substrate in both spider and bacterial PLDs [14]. Structural analysis indicates that the Lys residue might interact with the phosphate moiety of GDPDs substrates. Moreover, since the mutation K121A greatly reduces the enzymatic activity of the *Thermoanaerobacter tengcongensis* GDPD, suggesting that this Lys residue affects catalysis via electronic



**Fig. 1.** Structural alignment between LiRecDT1 (class II) and PLD I from *L. laeta* (class I). The LiRecDT1 residues involved in metal-ion binding and catalysis are presented in atom colors (PDB code: 3RLH). The Mg<sup>2+</sup> ion is shown as a green sphere. The catalytic, flexible, and variable loops are colored in blue, red, and green, respectively. Dark and light colors refer to LiRecDT1 and *L. laeta* PLD, respectively. The disulfide bridges are presented by orange sticks. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



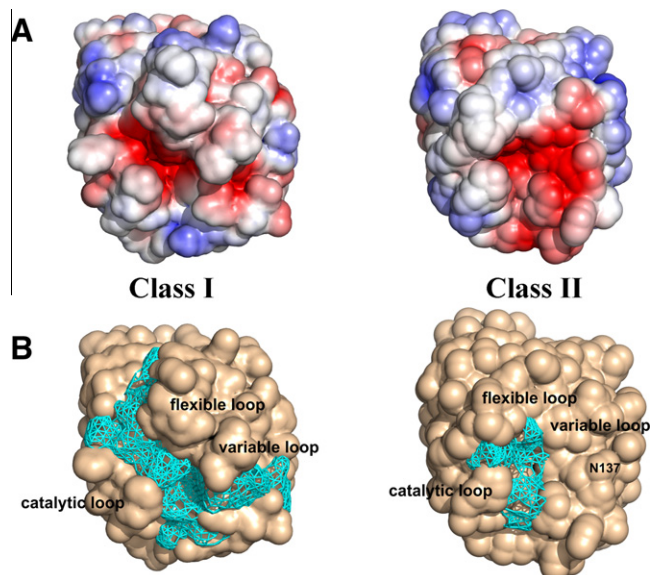
**Fig. 2.** Multiple sequence alignment of class I and II PLDs. Li\_1 (LiRecDT1, PDB code: 3RLH), Li\_2 (LiRecDT2, ABB69098.1), Li\_3 (LiRecDT3, ABB71184.1), Li\_4 (LiRecDT4, ABD91846.1), Li\_5 (LiRecDT5, ABD91847.1) and Li\_6 (LiRecDT6, ABO87656.1) are PLDs paralogs from *L. intermedia*. Li\_1 (AAM21154.1, PDB code: 1XX1) and Li\_2 (AAM21156.1) are isoforms from *L. laeta*, Lb\_1 (AAT66073.1) and Lb\_3 (AAT66074.1) are PLDs from *L. boneti* and Lr\_1 (AAT66075.1) is a PLD from *L. reclusa*. The symbols \* and # indicate PLDs with reduced or abolished sphingomyelinase activity, respectively. Residues involved in metal-ion binding and catalysis are boxed in green and red, while cysteines are boxed in yellow. Residues possibly involved in substrate binding and orientation are boxed in cyan. The numbers represent the class I PLD sequence. Stars indicate amino acid substitutions occurred specifically in PLDs with reduced or abolished sphingomyelinase activity. Blue stars refer to buried residues near the metal-binding site and pink stars refer to surface-exposed residues. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

interaction with the phosphate moiety of the substrate [34]. A similar role might be attributed to the corresponding Lys residue in spider PLDs.

Trp230, strategically located at the bottom of the active site, adopts different rotamer conformations depending on the presence of ligands (Fig. 4B and C). The equivalent in the GDPD from *Thermus thermophilus* is Trp192 (PDB code: 1VD6). In the presence of PEG (PDB code: 3RLH) or glycerol (PDB code: 1VD6) molecules, Trp230(192) forms one of the walls of the active site pocket, freeing space for ligand binding. The presence of a sulfate ion in the active site of class I PLD (PDB code: 1XX1) induces another conformation of Trp230 by the formation of a hydrogen bond between the NE1 nitrogen of Trp230 and the sulfate O1 atom. Contrastingly, in the ligand free form of class I PLD (PDB code: 2F9R), the Trp230 ring adopts a third conformation in which the torsion angle  $\chi_2$  changes by  $-90^\circ$  in relation to the Trp230 conformation in presence of PEG or glycerol. These findings suggest that Trp230 motions might play a pivotal role in substrate binding in both *Loxosceles* venom PLDs and bacterial GDPDs.

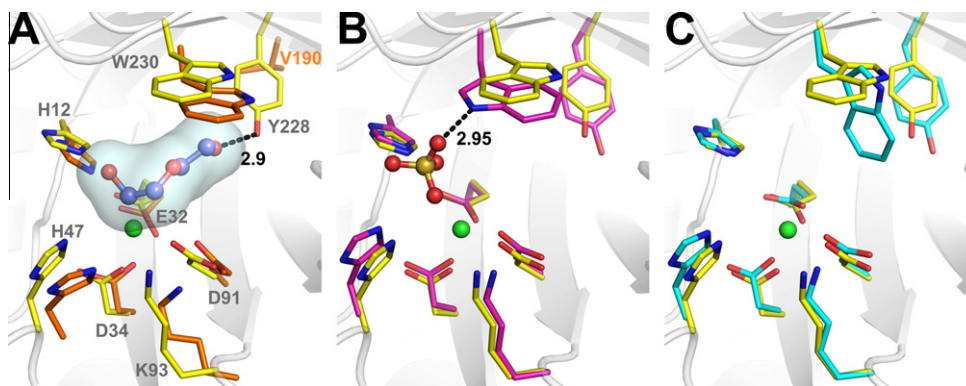
### 3.4. Functional diversification in spider venom PLDs

The spider venom PLDs encompass a gene family with multiple orthologs and paralogs, which differ in catalytic efficiency, substrate specificity or intensity of biological effects [7,10,11,15–19,35,36]. A structure-based classification segregates these enzymes into two major groups as mentioned in the introduction. This classification is in agreement with recent phylogenetic analysis of a large set of Sicariid spider venom PLDs, which grouped members of different classes into distinct branches belonging to



**Fig. 3.** Solvent accessible surface analyses of class I and II PLDs. (A) Electrostatic surface of class I (left) and II (right) PLDs are colored by charge, from red ( $-2$  kV) to blue ( $+2$  kV). Electrostatic potential was calculated using PBEQ solver [38]. (B) Representation of the largest cavities (cyan) in the respective class I and II PLD structures. Models are oriented according to Fig. 1. Class I PLD = PDB code: 1XX1, chain A. Class II PLD = PDB code: 3RLH. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)





**Fig. 4.** The active site. Structural alignment among class I and II PLDs and a glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) from *Thermus thermophilus*. (A) Representation of class II PLD (carbon atoms in yellow) and GDPD (carbon atoms in orange) superposed structures highlighting the PEG molecule (carbon atoms in violet) from the class II PLD structure. (B) Representation of class II PLD and class I PLD (carbon atoms in magenta) superposed structures showing the sulfate ion from the class I structure. (C) Representation of class II PLD and the sulfate-free class I (cyan C atoms) superposed structures. Nitrogen, oxygen, sulfur and magnesium atoms are colored blue, red, wheat and green, respectively. PDB codes: GDPD (1VD6:A), class I PLD (1XX1:D), sulfate free class I PLD (2F9R:B), class II PLD (3RLH). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

two major clades ( $\alpha$  and  $\beta$ ). Clade  $\alpha$  includes class I and IIa PLDs whereas clade  $\beta$  includes class IIb PLDs [36].

In an attempt to understand the structural determinants for the functional divergence of  $\beta$  clade members with reduced sphingomyelinase activity [15], we analyzed mutations exclusively observed in these enzymes (Fig. 2). Three of these mutations (S30G, T33L, F90M), are observed at the protein hydrophobic core and prediction of protein stability by the PoPMuSiC program [37] suggests that the substitutions S30G and F90M may have a destabilizing effect. The other substitutions are sparsely distributed on the LiRecDT1 surface relatively far from the catalytic pocket. Considering the long aliphatic tail of sphingomyelin, changes in the charge distribution and surface shape of the catalytic face induced by some of these mutations may affect the protein–lipid interaction and, consequently, their substrate affinity.

This analysis of the active site pockets in the structures of the class I, the class II and the modeled structure of Lb3 did not provide a clear explanation for the reduced or absent sphingomyelinase activity of LiRecDT3 and Lb3. These proteins conserve the  $Mg^{2+}$  binding site residues along with Lys93, Tyr228, Trp230 and the two catalytic histidine residues (His12 and His47) (Fig. 2 and Fig. S2). Moreover, the substitutions observed at their catalytic site are the same encountered in the active LI2 enzyme. This suggests that LiRecDT3, LiRecDT5 and Lb3 may not be devoid of catalytic activity but might possess affinity to other substrates. This hypothesis is supported by the fact that some spider venom PLDs demonstrates broad substrate selectivity [13–15].

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI) do Paraná, Fundação Araucária-PR, CNPq and CAPES, Brazil.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.053.

## References

- [1] J.M. Futrell, *Loxoscelism*, Am. J. Med. Sci. 304 (1992) 261–267.
- [2] H.H. Sams, C.A. Dunnick, M.L. Smith, L.E. King, Necrotic arachnidism, J. Am. Acad. Dermatol. 44 (2001) 561–573.

- [3] P.H. da Silva, R.B. da Silveira, M.H. Appel, O.C. Mangili, W. Gremski, S.S. Veiga, Brown spiders and loxoscelism, *Toxicon* 44 (2004) 693–709.
- [4] L.J. Forrester, J.T. Barrett, B.J. Campbell, Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D, *Arch. Biochem. Biophys.* 187 (1978) 355–365.
- [5] G. Kurpiewski, L.J. Forrester, J.T. Barrett, B.J. Campbell, Platelet aggregation and sphingomyelinase D activity of a purified toxin from the venom of *Loxosceles reclusa*, *Biochim. Biophys. Acta* 678 (1981) 467–476.
- [6] M.de F. Fernandes Pedrosa, I. de L.M. Junqueira de Azevedo, R.M. Gonçalves-de-Andrade, C.W. van den Berg, C.R.R. Ramos, P.L. Ho, et al., Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 638–645.
- [7] E. Kalapothakis, M. Chatzaki, H. Gonçalves-Dornelas, C.S. de Castro, F.G. Silvestre, F.V. Laborne, et al., The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitão) venom, *Toxicon* 50 (2007) 938–946.
- [8] D. Chaves-Moreira, O.M. Chaim, Y.B. Sade, K.S. Paludo, L.H. Gremski, L. Donatti, et al., Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom, *J. Cell. Biochem.* 107 (2009) 655–666.
- [9] O.M. Chaim, Y.B. Sade, R.B. da Silveira, L. Toma, E. Kalapothakis, C. Chávez-Olortegui, et al., Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211 (2006) 64–77.
- [10] L.A. van Meeteren, F. Frederiks, B.N.G. Giepmans, M.F.F. Pedrosa, S.J. Billington, B.H. Jost, et al., Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 10833–10836.
- [11] S. Lee, K.R. Lynch, Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA), *Biochem. J.* 391 (2005) 317–323.
- [12] O.M. Chaim, R.B. da Silveira, D. Trevisan-Silva, V.P. Ferrer, Y.B. Sade, M. Bóia-Ferreira, et al., Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity, *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (2011) 84–96.
- [13] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, S.A. de Andrade, A. Gabdoulkhakov, C. Betzel, D.V. Tambourgi, et al., Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342 (2006) 323–329.
- [14] M.T. Murakami, M.F. Fernandes-Pedrosa, D.V. Tambourgi, R.K. Arni, Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13658–13664.
- [15] R.B. de Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, J.L. Dreyfuss, L. Toma, et al., Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom gland, *Biochimie* 88 (2006) 1241–1253.
- [16] R.O.S. Ribeiro, O.M. Chaim, R.B. da Silveira, L.H. Gremski, Y.B. Sade, K.S. Paludo, et al., Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom, *Toxicon* 50 (2007) 1162–1174.
- [17] R.B. da Silveira, R.B. Pigozzo, O.M. Chaim, M.H. Appel, D.T. Silva, J.L. Dreyfuss, et al., Two novel dermonecrotic toxins LiRecDT4 and LiRecDT5 from Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom: from cloning to functional characterization, *Biochimie* 89 (2007) 289–300.
- [18] M.H. Appel, R.B. da Silveira, O.M. Chaim, K.S. Paludo, D.T. Silva, D.M. Chaves, et al., Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 167–178.

- [19] G.I. de Santi Ferrara, M.deF. Fernandes-Pedrosa, I. de L.M. Junqueira-de-Azevedo, R.M. Gonçalves-de-Andrade, F.C.V. Portaro, D. Manzoni-de-Almeida, et al., SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis, *Toxicon* 53 (2009) 743–753.
- [20] A. Ullah, P.O. de Giuseppe, M.T. Murakami, D. Trevisan-Silva, A.C.M. Wille, D. Chaves-Moreira, et al., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom, *Acta Crystallogr. F67* (2011) 234–236.
- [21] Z. Otwinowski, W. Minor, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, in: *Macromolecular Crystallography Part A*, Academic Press, 1997, pp. 307–326.
- [22] A. Vagin, A. Teplyakov, MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 1022–1025.
- [23] G.N. Murshudov, A.A. Vagin, E.J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr. D53* (1997) 240–255.
- [24] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D60* (2004) 2126–2132.
- [25] E. Krissinel, K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.
- [26] V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, et al., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D66* (2010) 12–21.
- [27] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, (2002).
- [28] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3381–3385.
- [29] M. Wiederstein, M.J. Sippl, ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) W407–W410.
- [30] J.A. Grobler, L.-O. Essen, R.L. Williams, J.H. Hurley, C2 domain conformational changes in phospholipase C- $\delta$ 1, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 3 (1996) 788–795.
- [31] C.S. Güssler, M. Ryan, T. Liu, O.H. Griffith, D.W. Heinz, Probing the roles of active site residues in phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* by site-directed mutagenesis, *Biochemistry* 36 (1997) 12802–12813.
- [32] K.N. Rao, J.B. Bonanno, S.K. Burley, S. Swaminathan, Crystal structure of glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Agrobacterium tumefaciens* by SAD with a large asymmetric unit, *Proteins* 65 (2006) 514–518.
- [33] R.A. Laskowski, SURFNET: a program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions, *J. Mol. Graph.* 13 (1995) 323–330.
- [34] L. Shi, J.F. Liu, X.-M. An, D.C. Liang, Crystal structure of glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, a metal ion-dependent enzyme: insight into the catalytic mechanism, *Proteins* 72 (2008) 280–288.
- [35] S.A. de Andrade, M.T. Murakami, D.P. Cavalcante, R.K. Arni, D.V. Tambourgi, Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases D from *Loxosceles intermedia* spider venom, *Toxicon* 47 (2006) 380–386.
- [36] G.J. Binford, M.R. Bodner, M.H.J. Cordes, K.L. Baldwin, M.R. Rynerson, S.N. Burns, et al., Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms, *Mol. Biol. Evol.* 26 (2009) 547–566.
- [37] Y. Dehouck, A. Grosfils, B. Folch, D. Gilis, P. Bogaerts, M. Rooman, Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC-2.0, *Bioinformatics* 25 (2009) 2537–2543.
- [38] S. Jo, M. Vargyas, J. Vasko-Szedlar, B. Roux, W. Im, PBEQ-solver for online visualization of electrostatic potential of biomolecules, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) W270–W275.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

1 - *Loxosceles* Astacin-Like Proteases (LALPs), an astacin metalloprotease family from the brown spider venom.

Trevisan-Silva D, Gremski LH, Chaim O M, Senff-Ribeiro A, Veiga SS.

Handbook of proteolytic enzymes, 3<sup>rd</sup>, Chapter 86, Academic Press - Elsevier.  
Release date Jan 2013.

## HISTÓRICO ESCOLAR



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Programa de Pós-Graduação em Biologia  
Celular, Molecular e Fisiologia



## HISTÓRICO ESCOLAR – DOUTORADO



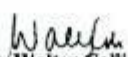
Aluno(a): <b>Dilza Trevisan Silva</b> Curso: <b>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular</b> Instituição: <b>Universidade Federal do Paraná</b> Área de Concentração: <b>Biologia Celular e Molecular</b> Data de Mudança de Nível: <b>Setembro de 2009</b> Nível: <b>Doutorado</b> Orientador(a): <b>Profª. Drª. Andrea Senff Ribeiro</b>						
Conceito do Curso: <b>5 (Portaria do MEC 524, DOU 30/04/2008 – Parecer CES/CNE 33/2008 – 29/04/2008).</b> Curso reconhecido pela Portaria nº 8531/01-72, da Resolução Nº: 89/01 A-CEPE - Currículo disciplinas: 2007/2009.						
<b>Código / Disciplinas</b>	<b>Cursadas</b>	<b>Mestrado e Doutorado</b>	<b>Ano</b>	<b>C. H.</b>	<b>N. de Cr.</b>	<b>Conc.</b>
BC-756	Biologia Celular		2008	120	08	A
BQ-772	Métodos de Análises de Proteínas		2008	90	03	A
BC-757	Seminários		2008	30	02	A
BC-784	Fundamentos em Biologia Molecular		2008	60	04	A
BC-770	Matriz Extracelular		2008	45	03	A
BQ-744	Análise Conformacional de Proteínas		2008	60	03	B
BC-783	Estágio de Docência em Biologia Celular		2009	60	02	A
BC 796	Tópicos Contemporâneos em Biologia Celular e Molecular-Seminários		2009	15	01	A
BC- 787	Biologia Computacional		2009	90	05	A
BC-795	Ensino em Biologia Celular		2009	60	04	A
BP-701	Imunologia Avançada I e II		2010	45	03	A
BC-769	Tópicos em Biologia do Desenvolvimento		2010	15	01	A
BC-757	Seminários		2011	30	02	A
<b>Total Créditos / Carga Horária Cursados(a):</b>				<b>690</b>	<b>39</b>	
Exame de proficiência na língua Inglesa: 25 de abril de 2009 DELEM/UFPR - Aprovada						
Qualificação: Homologada em Reunião do Colegiado do dia 17/04/2012 - Aprovada						
Serão considerados aprovados em disciplinas, os candidatos que lograrem os conceitos <b>A, B, ou C</b> . Obter no mínimo <b>36 créditos em disciplinas</b> .						
Data da Defesa da Tese:						
Título: ""						
Resultado Final:						
Composição da Banca Examinadora						
Nome:		Instituição:				
Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro (Universidade Federal do Paraná - UFPR)						

Curitiba, 07 de Agosto de 2012

*Martine Bonifácio de Camargo*  
 Martine Bonifácio de Camargo  
 Secretária da Pós-Graduação em  
 Biologia Celular e Molecular - UFPR  
 Matr. 094315


CENTRO POLITÉCNICO – JARDIM DAS AMÉRICAS – Caixa Postal – 19031 – FONE – (41) 3361-1676 FAX – (41) 3266-2042 – E-mail – [pgbiocel@ufpr.br](mailto:pgbiocel@ufpr.br) – [www.pgbiocel.ufpr.br](http://www.pgbiocel.ufpr.br) CEP. 81.531-990 – CURITIBA - PARANÁ

## PARECER TÉCNICO CTNBio

	<b>Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT</b> <b>Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio</b>	
<b>PARECER TÉCNICO Nº 542/2006</b>		
<b>Processo nº:</b> 01200.000022/1997-37 <b>Requerente:</b> Setor de Ciências Biológicas – UFPR. <b>CNPJ:</b> 000.348.003/0055-03 <b>Endereço:</b> Centro Politécnico da UFPR- Setor de Ciências Biológicas - 2º Piso, Sala 295 - Caixa Postal 19031 Paraná/PR. <b>Assunto:</b> Solicitação de Extensão do CQB 009/97 <b>Extrato Prévio:</b> 350/2006 Publicado no D.O.U. de 21 de fevereiro de 2006 <b>Reunião:</b> 90ª Reunião Ordinária da CTNBio, ocorrida em 19 de abril de 2006 <b>Decisão:</b> DEFERIDO		
<p>A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à Solicitação de Extensão do CQB (Certificado de Qualidade em Biossegurança) 009/97, conclui pelo DEFERIMENTO, nos termos deste Parecer Técnico. No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.</p>		
<b>PARECER TÉCNICO</b>		
<p>1) Fundamentação técnica</p> <p>Solicita à CTNBio Parecer Técnico para a extensão de seu CQB do Setor de Ciências Biológicas (UFPR) para a sala de número 198B e sala Preparativa, ambas do departamento de Biologia Celular do mesmo setor. Foram apresentados no processo os currículos dos pesquisadores, a planta baixa do laboratório, o projeto a ser desenvolvido nele assim como as medidas de biossegurança.</p>		
<p>2) Medidas de biossegurança descritas no processo.</p> <p>Os microrganismos a serem manipulados no projeto (bactérias e leveduras) são da classe de segurança I mas, como os genes a serem expressos (toxinas de animais peçonhentos), apresentam riscos à saúde humana o laboratório que solicita a extensão de CQB tem que ser do tipo NB-2. Embora no processo não haja menção específica sobre a classe laboratorial na qual se encaixa este laboratório, todos os equipamentos apresentados são perfeitamente compatíveis com a classe NB-2, portanto, adequados para as manipulações propostas no projeto. Também foram apresentados as medidas adequadas para o transporte dos microrganismos da sala de manipulação (198B) para a sala de esterilização (sala Preparativa). Além disso, foi informado que as instalações acima mencionadas têm acesso a serviço médico emergencial no próprio setor de Ciências Biológicas da UFPR que contém um centro de atendimento médico para alunos, funcionários e professores além do Hospital Universitário.</p> <p>Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança, recomenda-se, contudo, que sejam devidamente observadas as práticas laboratoriais compatíveis com a classe laboratorial NB-2.</p>		
 <b>Dr. Walter Colli</b> <b>Presidente da CTNBio</b>		
<b>Secretaria Executiva da CTNBio</b> SPO – Arca 05 – Quadra 03 Bloco B – Térreo – Salas 08 a 10 Brasília, DF – CEP: 70610-200 Fones: (55)(61) 3411 5516 – FAX: (55)(61) 3317-7475		



## AUTORIZAÇÃO DO IBAMA

 Ministério do Meio Ambiente - MMA Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO					
<b>Autorização para atividades com finalidade científica</b>					
<b>Número:</b> 29801-1	<b>Data da Emissão:</b> 11/08/2011 18:47				
<b>Dados do titular</b>					
<b>Nome:</b> Silvio Sanches Veiga	<b>CPF:</b> 078.970.128-67				
<b>Título do Projeto:</b> Avaliação bioquímica e biológica de toxinas loxosômicas recombinantes					
<b>Nome da Instituição:</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	<b>CNPJ:</b> 75.095.679/0001-49				
<b>Cronograma de atividades</b>					
#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)		
1	Coleta de veneno, hemolinfa e glândulas produtoras de veneno	08/2011	12/2014		
2	Coleta dos espécimes de aranha-mamom	08/2011	12/2014		
3	Processamento das amostras coletadas (análises qualitativas e quantitativas do veneno e hemolinfa)	09/2011	12/2014		
4	Processamento das amostras coletadas (extração de RNA total das glândulas, análises qualitativas)	09/2011	12/2014		
5	Desenho de oligonucleotídeos específicos para as toxinas de interesse	10/2011	12/2013		
6	Obtenção das sequências completas das toxinas de interesse	10/2011	12/2013		
7	Clonagem das sequências das proteínas maduras em vetor	11/2011	12/2013		
8	Transfecção e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014		
9	Confecção de artigos científicos e apresentação de trabalhos em congressos da área	12/2011	12/2014		
10	Purificação das Proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014		
11	Transformação e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014		
12	Análise de atividade biológica das proteínas recombinantes	02/2012	12/2014		
13	Análise em Microscopia Confocal, Citometria de Fluxo e Espectropolarímetro	02/2012	12/2014		
14	Imunização de animais para verificação da imunogenicidade de toxinas recombinantes	04/2012	01/2014		
15	Realização de imunossaios para pesquisa de terapias racionais	04/2014	07/2014		
16	Experimentos de Cristalografia das toxinas recombinantes de interesse	05/2014	12/2014		
17	Análise dos dados cristalográficos	07/2014	12/2014		
<b>Observações e ressalvas</b>					
1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.				
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.				
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.				
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.				
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.				
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/gen">www.mma.gov.br/gen</a> .				
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DADOS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.				
<b>Equipe</b>					
#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andrea Benf Ribeiro	Pesquisador	024.183.219-59	36797524 SSP-PR-PR	
2	Olga Meiri Chaim	Pesquisador	034.415.729-63	72178823 SSP-PR-PR	